

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



TESIS DOCTORAL

**Efecto sobre los alérgenos de las larvas L3 de *anisakis* al aplicar
tratamientos selectivos en pescado parasitado**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Fabiola Otilia Olivares Ponce

Directora

Margarita Tejada Yábar

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



**EFFECTO SOBRE LOS ALÉRGENOS DE LAS LARVAS L3 DE
ANISAKIS AL APLICAR TRATAMIENTOS SELECTIVOS EN
PESCADO PARASITADO**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Fabiola Otilia Olivares Ponce

Bajo la dirección de la doctora

Margarita Tejada Yábar

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos



**EFFECTO SOBRE LOS ALÉRGENOS DE LAS LARVAS L3 DE
ANISAKIS AL APLICAR TRATAMIENTOS SELECTIVOS EN
PESCADO PARASITADO**

TESIS DOCTORAL

Fabiola Otilia Olivares Ponce

Madrid, 2012



Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Nutrición, Bromatología y
Tecnología de los Alimentos



Instituto de Ciencia y Tecnología de
Alimentos y Nutrición
Departamento de Productos

EFFECTO SOBRE LOS ALÉRGICOS DE LAS LARVAS L3 DE ANISAKIS AL APLICAR TRATAMIENTOS SELECTIVOS EN PESCADO PARASITADO

Memoria que presenta **Fabiola Otilia Olivares Ponce** para optar el
grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Bajo la dirección de la Dra. Margarita Tejada Yábar, actuando como
tutora la Dra. Manuela Fernández Álvarez

Madrid, 2012



Margarita Tejada Yábar, Doctora en Veterinaria, Profesora de Investigación del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)

CERTIFICA:

Que la presente memoria titulada **EFFECTO SOBRE LOS ALÉRGICOS DE LAS LARVAS L3 DE ANISAKIS AL APLICAR TRATAMIENTOS SELECTIVOS EN PESCADO PARASITADO**, presentada por **Fabiola Otilia Olivares Ponce** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) bajo su dirección, y que hallándose concluida, autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo el presente Certificado en Madrid a veinte de septiembre del dos mil doce.

Margarita Tejada Yábar

Directora de la Tesis Doctoral

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00. ext : 238
FAX: 91 549 36 27
E-mail: mtejada@ictan.csic.es

SEDE JUAN DE LA CIERVA:

C/JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 562 29 00
FAX: 91 564 48 53



El trabajo que ha dado origen a la presente Memoria, ha sido realizado en el Departamento de Productos del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), financiado por el proyecto del Plan Nacional I+D+i español AGL2009-12485-C03-01/03 (ANIDET) y por la beca concedida por el Programa de Ciencia y Tecnología del Gobierno de Perú (FINCyT) administrada por LASPAU.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer especialmente a la Dra. Margarita Tejada por la dirección de este trabajo de investigación, no sólo por su aportación científica sino también por su paciencia, dedicación, estímulo constante y apoyo incondicional para la realización de la misma.

A la dirección del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por las facilidades prestadas para la realización de esta Tesis Doctoral.

A la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM), mi alma mater y centro laboral, por haberme brindado las facilidades para la realización de los estudios de doctorado.

A la Dra. Manuela Fernández Álvarez, tutora de este trabajo en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, por su colaboración en la presentación de esta memoria de Tesis Doctoral.

A la Dra. María Teresa Solas del Departamento de Biología Celular y a Dña. María Luisa García del ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica de la Universidad Complutense de Madrid, por la importante colaboración con las fotos de microscopia electrónica de barrido, inmunohistoquímica y su constante aportación a este trabajo.

A los Dres. Miguel González-Muñoz, Ignacio Moneo y Dña. Noelia Carballeda-Sangiao del Departamento de Inmunología, así como a la Dra. Ana Rodríguez-Mahillo de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Carlos III, por la importante colaboración en la inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*.

Al Dr. Alfonso Navas del Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN) del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), por su apoyo en la identificación de las larvas de *Anisakis*.

Al Dr. Angel Mendizabal de la Unidad Técnica de Mercamadrid, Instituto de Salud Pública, Madrid-Salud, Ayuntamiento de Madrid, por la colaboración en el suministro de muestras de pescado y larvas de *Anisakis*.

A Cristina de la Heras por haberme enseñado a desenvolverse en el laboratorio, su constante apoyo y cuyo trabajo ha facilitado la realización de esta Tesis.

A Carmen de la Mata (*mi impresora favorita*) no sólo por su apoyo incondicional en el trabajo de laboratorio, sino por su maravillosa amistad.

A Tatiana Bonilla, Inmaculada López y Pilar Moreno por ser unas ayudantes de laboratorio estupendas.

A mis compañeras y compañeros del ICTAN, sin olvidar aquellos que comenzaron conmigo pero que actualmente ya no están, por lo buenos momentos que hemos pasado juntos y por hacer más llevaderos aquellos que no lo fueron tanto. Os echare de menos.

A mis padres, Otilia y Américo que a pesar de la distancia estuvieron a mi lado apoyándome y alentándome a continuar en los momentos difíciles, sin ellos no hubiera llegado a ser lo que soy.

A Gisella y Emilio por haber soportado todas y cada una de las distintas fases de mi estado de ánimo, enseñándome a ver la vida de un modo diferente y sobretodo permitiéndome compartir con ellos estos últimos 4 años. Y como no, a Beatriz por inyectarme cada día un poquito de su vitalidad y alegría.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	7
1.1 <i>Anisakis</i> spp	9
1.1.1 Taxonomía.....	9
1.1.2 Características morfológicas	12
1.1.3 Ciclo biológico de <i>Anisakis</i>	14
1.1.4 Distribución geográfica	17
1.2 Huéspedes	19
1.2.1 Principales especies infestadas	19
1.2.2 Localización en peces y cefalópodos.....	22
1.3 Problemática causada por Anisákidos.....	23
1.4 Legislación	27
1.4.1 Europea.....	27
1.4.2 Española	29
1.5 Medidas para prevenir la presencia de larvas de <i>Anisakis</i>	30
1.5.1 Sector extractivo	31
1.5.2 Industria transformadora	32
1.5.3 Acuicultura	32
1.6 Técnicas de detección de larvas de <i>Anisakis</i>	33
1.6.1 Viabilidad de las larvas	33
1.6.2 Detección de las larvas	34
1.7 Tratamientos tecnológicos aplicados para la inactivación de las larvas de <i>Anisakis</i>	38
1.7.1 Congelación.....	38
1.7.2 Calentamiento.....	39
1.7.3 Adición de salmuera.....	40
1.7.4 Marinado	40
1.7.5 Ahumado	41
1.7.6 Altas presiones	41
1.7.7 Electrocutación.....	42
1.7.8 Irradiación	42
1.7.9 Adición de extractos vegetales y otros productos	43
1.8 Antígenos y alérgenos de <i>Anisakis</i>	43
1.8.1 Antígenos somáticos.....	44
1.8.2 Antígenos de excreción-secreción (ES).....	44
1.8.3 Antígenos de superficie	45
1.8.4 Alérgenos de <i>A. simplex</i>	45
1.9 Técnicas de detección de alérgenos de <i>Anisakis</i>	50
1.9.1 Inmunodetección	51
1.9.2 Inmunohistoquímica.....	54
1.10 Estudios realizados en <i>Anisakis</i>	55
1.10.1 Principales estudios tecnológicos realizados en el proyecto ANITRAT	56

2	OBJETIVOS	61
3	MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES	65
3.1	Recepción de muestras de trabajo.....	67
3.2	Metodología empleada en el análisis de las muestras.....	69
3.2.1	Identificación taxonómica de larvas de <i>Anisakis</i> spp	69
3.2.2	Análisis elementales y pH	70
3.2.2.1	Humedad	70
3.2.2.2	Proteína bruta	71
3.2.2.3	Cenizas	71
3.2.2.4	Grasa bruta	71
3.2.2.5	pH.....	71
3.2.3	Evaluación y cuantificación de las modificaciones de las proteínas del músculo de pescado.....	71
3.2.3.1	Proteína soluble en soluciones salinas.....	71
3.2.3.2	Extracción de actomiosina natural	72
3.2.3.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida	73
3.2.4	Evaluación de la textura y color en geles	74
3.2.4.1	Análisis de penetración	74
3.2.4.2	Medida instrumental del color.....	74
3.2.5	Evaluación de las muestras por microscopía electrónica de barrido	74
3.2.6	Extracción e inmunodetección de alérgenos de <i>Anisakis</i>	75
3.2.6.1	Antígenos y antisuero empleados.....	76
3.2.6.2	Inmunodetección	76
3.2.6.2.1	Extracción de alérgenos en larvas de <i>Anisakis</i>	76
3.2.6.2.2	Extracción de alérgenos en músculo de pescado y derivados	77
3.2.6.2.3	Western-blot	77
3.2.6.2.4	Dot-blot.....	78
3.2.6.3	Inmunohistoquímica.....	79
3.3	Análisis estadístico	81
4	EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ANTÍGENOS DE ANISAKIS	83
4.1	Modificación de los parámetros de sonicación.....	86
4.1.1	Objetivo	87
4.1.2	Diseño del experimento	87
4.1.3	Resultados y discusión	91
4.2	Digestión con pepsina	97
4.2.1	Objetivo	98
4.2.2	Diseño del experimento	99
4.2.3	Resultados y discusión	103

5	APLICACIÓN DE PROCESOS TECNOLÓGICOS PARA REDUCIR O ELIMINAR LA ALERGENICIDAD	109
5.1	Sistemas modelo de tratamiento térmico de esterilización en productos de la pesca	112
5.1.1	Objetivo	114
5.1.2	Diseño del experimento	115
5.1.3	Resultados y discusión	123
5.2	Estudio comparativo en el tiempo en músculo congelado con infestación natural y artificial.....	135
5.2.1	Objetivo	136
5.2.2	Diseño del experimento	137
5.2.3	Resultados y discusión	142
5.3	Aplicación de la tecnología de obtención de surimi-geles	153
5.3.1	Efecto de la separación mecánica del músculo	159
5.3.1.1	Objetivo	159
5.3.1.2	Diseño del experimento	159
5.3.1.3	Resultados y discusión	166
5.3.2	Estudios preliminares de lavados y determinación de límites de detección de alérgenos de <i>Anisakis</i>	173
5.3.2.1	Lavados sucesivos tipo surimi y concentración de proteínas de las soluciones de lavado.....	173
5.3.2.1.1	Objetivo.....	174
5.3.2.1.2	Diseño del experimento	175
5.3.2.1.3	Resultados y discusión	179
5.3.2.2	Lavados sucesivos tipo surimi y selección de soluciones de lavado	184
5.3.2.2.1	Objetivo.....	185
5.3.2.2.2	Diseño del experimento	186
5.3.2.2.3	Resultados y discusión	189
5.3.3	Lavados sucesivos en músculo infestado refrigerado y en músculo infestado conservado en congelación	199
5.3.3.1	Objetivo	200
5.3.3.2	Diseño del experimento.....	200
5.3.3.3	Resultados y discusión	207
5.3.4	Elaboración de surimi y efecto de la conservación en congelación	218
5.3.4.1	Objetivo	220
5.3.4.2	Diseño del experimento	220
5.3.4.3	Resultados y discusión	223
5.3.5	Elaboración de geles y efecto de la conservación en congelación de geles.....	231
5.3.5.1	Objetivo	233
5.3.5.2	Diseño del experimento.....	233
5.3.5.3	Resultados y discusión	238

6	CONCLUSIONES	263
7	BIBLIOGRAFÍA	267
8	ANEXOS	309
	Anexo 1: Abreviaturas	311
	Anexo 2: Listado de Tablas	315
	Anexo 3: Listado de Figuras.....	317

RESUMEN

RESUMEN

El objetivo general del trabajo de investigación fue diseñar estrategias para disminuir o eliminar la presencia de antígenos de *Anisakis* spp. en pescado y productos de la pesca infestados con larvas L3.

Como punto de partida de la investigación, se verificó que la sensibilidad y precisión de las técnicas de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* habitualmente utilizadas en pescado y productos de la pesca, fuera aplicable en condiciones más extremas de conservación o tratamiento. Se realizaron trabajos comparativos sobre muestras con infestación natural controlada e infestación artificial, aplicando modificaciones en los parámetros de sonicación (potencia-tiempo), o incluyendo una etapa de digestión con pepsina a fin de liberar la mayor cantidad de proteína alergénica para que pueda ser analizada por inmunodetección, o evaluando el impacto de la agregación de la proteína del músculo durante la conservación en congelación prolongada.

Todas las modificaciones en la técnica de extracción y las condiciones de conservación utilizadas permitieron la identificación de antígenos y alérgenos en las condiciones ensayadas, estableciéndose que las condiciones estándar de la técnica son suficientes para lograr una inmunodetección adecuada de los alérgenos de *Anisakis* en pescado y productos de la pesca.

Teniendo en cuenta las características de las proteínas (número de grupos -SH, punto isoeléctrico, etc.) de varios alérgenos descritos hasta la fecha, se establecieron estrategias que permitieron conocer su estabilidad a distintos tratamientos, utilizando en todos los casos lotes de pescado infestado en condiciones controladas (infestación artificial). El potencial alergénico del pescado y productos de la pesca fue evaluado en pescado y productos de la pesca obtenidos de 3 tratamientos tecnológicos: Sistemas modelo de tratamiento térmico de esterilización, conservación en congelación prolongada y elaboración de surimi y geles de surimi.

En músculo infestado, dependiendo de las condiciones de proceso aplicadas (líneas de procesamiento, líquido de gobierno y tratamientos térmicos) se estableció que el tratamiento térmico de esterilización produce un descenso en la detección de Anisakis 4 y Extracto crudo de *A. simplex*, mientras que con la conservación en congelación prolongada la detección de Anisakis 4 no disminuyó y mantuvo la misma tendencia hasta el final de la conservación (hasta 406 días).

El proceso de elaboración de surimi y geles de surimi se dividió en 4 etapas. En la separación mecánica del músculo (Etapa I) dependiendo del diámetro de los orificios del tamiz, la presencia de larvas en el músculo tamizado disminuyó pero también se produjo una mayor rotura de las larvas.

En la etapa de lavados sucesivos (Etapa II), la eliminación de las proteínas alergénicas del músculo infestado se vieron reflejadas en la detección de Anisakis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* en las soluciones de lavado, variación que dependió de las condiciones de lavado aplicadas.

En la Etapa III al evaluar el efecto de las diferentes condiciones de conservación del surimi (refrigeración y congelación) se comprobó que la conservación del surimi en congelación produce un descenso en la detección de Anisakis 4, efecto que no se observó para Extracto crudo de *A. simplex*. La adición de diferentes combinaciones de crioprotectores en el surimi no presentó un efecto claro en la detección de alérgenos de *Anisakis*.

En la última etapa (Etapa IV), en los geles elaborados con surimi refrigerado y conservado en congelación se determinó que el tratamiento térmico aplicado en la elaboración de geles favoreció en la menor detección de Anisakis 4, efecto que fue más evidente al elaborar geles con surimi conservado en congelación que cuando los geles se congelaron en las mismas condiciones. La adición de citral en la formulación de los geles en algunos lotes favoreció en la menor detección de alérgenos de *Anisakis*, sin embargo, debido a las características sensoriales que impartió a los geles, no tendrían aceptación comercial.

La disminución en la detección de alérgenos de *Anisakis* en músculo infestado sometido a procesos tecnológicos de tratamiento térmico de esterilización y de elaboración de surimi y geles, abre una vía de utilización de zonas musculares altamente infestadas. Sin embargo, al detectarse una alergenidad residual implica que estos productos pueden suponer un riesgo en la salud de consumidores previamente sensibilizados.

1 INTRODUCCION

1 INTRODUCCION

1.1 *Anisakis* spp.

1.1.1 Taxonomía

Los nematodos “ascarioideos” de la familia Anisakidae (Nematoda: Rhabditida: Ascaridomorpha) son parásitos de mamíferos marinos que acaban infestando al hombre al ingerir pescado o moluscos que son huéspedes intermediarios del estadio larvario L3. La familia Anisakidae comprende al menos 24 géneros, siendo los más conocidos *Phocascaris*, *Phocananea*, *Contracaecum* y *Anisakis*. En la actualidad hay descritas al menos nueve especies de *Anisakis* (Mattiucci *et al.*, 2002; 2007; 2008; 2009; Mattiucci y Nascetti, 2006; 2008), sin embargo, *Anisakis simplex* es el principal responsable de los episodios de parasitosis y alergia alimentaria, considerándose como un problema emergente en los últimos años (Audicana *et al.*, 2002; Audicana y Kennedy, 2008). Se estima que *Phocananea* (*Pseudoterranova*) y *Contracaecum* (*Thynascaris*) son de menor importancia aunque desde el punto de vista epidemiológico es necesario evaluar su incidencia real en la población, especialmente en lo relativo a sensibilización a alérgenos.

Los Anisákidos han sido ampliamente estudiados con respecto a su taxonomía y ciclos de vida. Sin embargo, la clasificación taxonómica del género *Anisakis* es compleja y ha suscitado controversia (Mattiucci y Nascetti, 2006; 2008). La clasificación más aceptada es la sugerida por Smith y Wootten (1978).

Phylum Nematelminthes
 Clase Nematoda
 Sub clase Secernentea
 Orden Ascarida
 Sub orden Ascaridina
 Super familia Ascaridoidea
 Familia Anisakidae
 Subfamilia Anisakinae
 Género *Anisakis*

Aunque posteriormente De Ley y Blaxter (2004) han sugerido una segunda sistemática de clasificación que sigue el siguiente esquema:

Clase Chromodorea
Orden Rhabditida
Sub orden Rhabditina
Infra orden Ascaridomorpha
Super familia Ascaridoidea
Familia Anisakidae
Sub familia Anisakinae
Género *Anisakis*

La necesidad de identificar las distintas especies de *Anisakis*, es de especial importancia ya que se han visto implicadas como agente causal de la Anisakidosis humana. En la actualidad, las distintas especies del género *Anisakis* están incluidas en dos grupos (Tipo I y II) en función a su morfología (Berland, 1961) y, debido a los avances taxonómicos relacionados con aspectos ecológicos y a la distribución geográfica de los hospedadores, ha sido posible reconocer genéticamente nueve especies de nematodos pertenecientes al género *Anisakis*. Estas nuevas especies han sido establecidas mediante análisis de marcadores genéticos (Figura 1.1).

El análisis mediante electroforesis de enzimas multilocus ha permitido redefinir el complejo de *A. simplex*, denominado *sensu lato* (Björkstén *et al.*, 2008), demostrando la existencia de tres especies gemelas denominadas *A. pegreffii*, *A. simplex sensu stricto* (*s.s.*) y *A. simplex C*, que difieren en su estructura genética, así como en las preferencias ecológicas, hospedadores y distribución geográfica (Mattiucci *et al.*, 2007; Mattiucci y Nascetti, 2008). Si bien es cierto estas especies son iguales morfológicamente, enzimáticamente son diferentes e inclusive se han comprobado diferencias patológicas (Kirstein *et al.*, 2007).

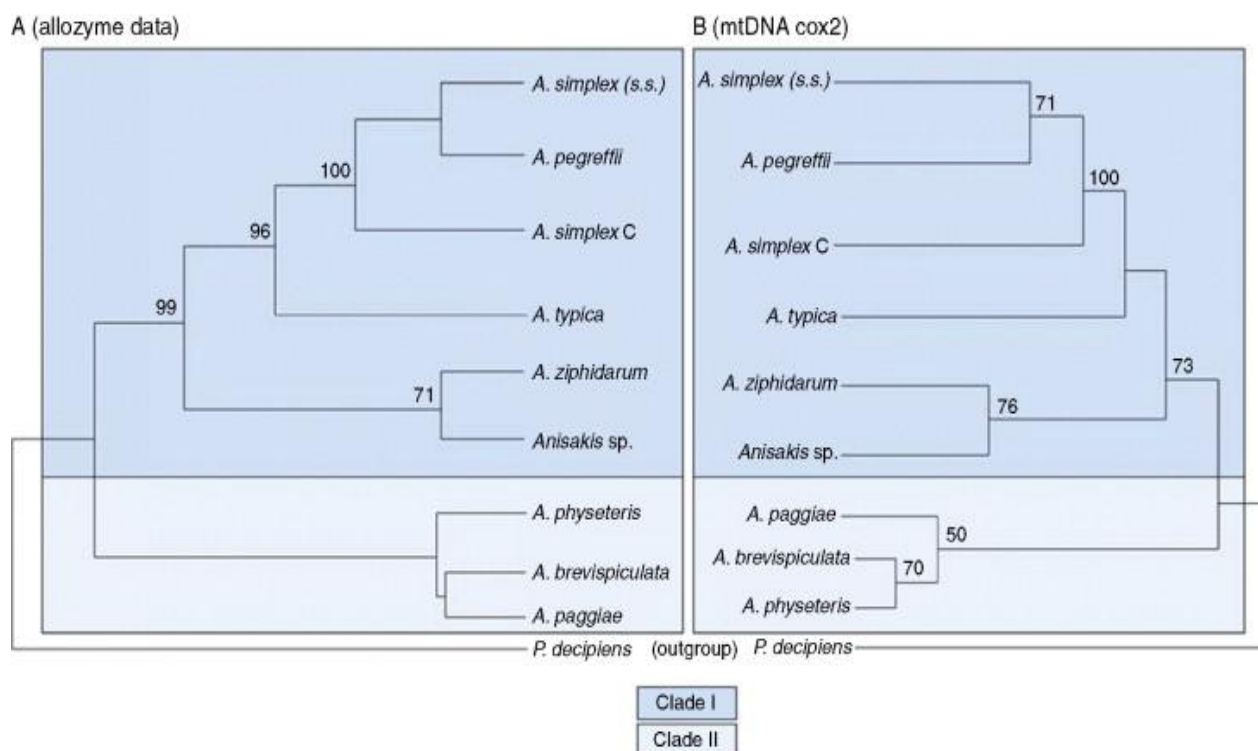


Figura 1.1 Especies del género *Anisakis* obtenidas por análisis genéticos (Mattiucci y Nascetti, 2008).

La aportación realizada por la técnica de electroforesis de isoenzimas (Mattiucci *et al.*, 1986; 1997; 1998; 2001; 2002; 2003; 2004; Mattiucci y Nascetti, 2008) ha sido esencial y ha constituido la base de los estudios realizados posteriormente con otros marcadores genéticos, tales como el generado con la técnica de PCR-RFLP del ITS1-5,8-ITS2 (D'Amelio *et al.*, 2000; Pontes *et al.*, 2005; Farjallah *et al.*, 2008); sin embargo, no está exenta de limitaciones debido a su complejidad en la interpretación de los patrones de bandas y la necesidad de gran cantidad de material biológico (Abattouy, 2012).

La aplicación de la técnica PCR-RFLP del ITS1-5,8-ITS2 ha permitido comprobar la existencia de genotipos híbridos entre *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii* y se ha puesto de manifiesto en larvas L3 procedentes de peces capturados en las costas mediterráneas y atlánticas españolas (D'Amelio *et al.*, 2000; Abollo *et al.*, 2003; Martín-Sánchez *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2006), en aguas japonesas (Umehara *et al.*, 2006)

y más recientemente en las costas mediterráneas norte africanas (Abbatouy *et al.*, 2011; Abbatouy, 2012).

1.1.2 Características morfológicas

En cuanto a la morfología, se ha establecido que tienen un cuerpo vermiforme, sin segmentación y puntiagudo en los extremos. Las larvas de *A. simplex* son de color blanquecino o parda cuando están encapsuladas en el músculo de los peces; tienen una longitud entre 15-30 mm y un diámetro de 0,10-0,6 mm (Smith, 1983). La epidermis segrega una cutícula de 1,50 µm de grosor (Fredericksen y Specian, 1981) y se caracteriza por poseer estriaciones finas y transversales más marcadas cerca de los extremos del nematodo (Fukuda *et al.*, 1988).

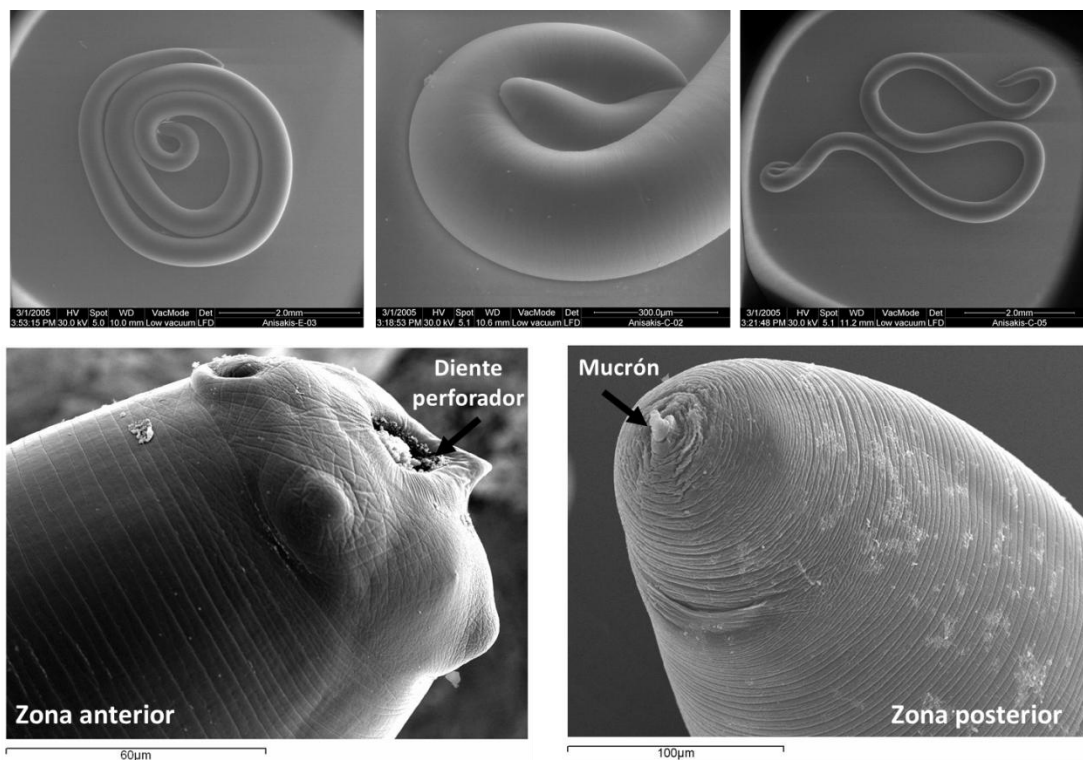


Figura 1.2 Imágenes de larvas de *Anisakis simplex* (tomadas del Proyecto ANITRAT)

El sistema digestivo es completo disponiendo de boca, esófago, intestino y ano. La cavidad bucal es triangular y dispone de varios labios, en el extremo anterior posee un diente cuticular (diente perforador) que el parásito utiliza para la fijación y/o penetración en el hospedador y es en la base de los labios donde se encuentra el poro excretor (Möller y Anders, 1986). El esófago mide de 2,5 a 3,0 mm de longitud y tiene dos porciones bien diferenciadas: una anterior muscular llamada proventrículo y otra posterior glandular denominada ventrículo (Osanz Mur, 2001). El intestino carece de apéndices esofágicos y ocupa la mayor parte de la longitud de la larva, el extremo posterior es redondeado y acaba en un mucrón o espina (Möller y Anders, 1986; Pereira-Bueno, 1992).

Poseen un sistema nervioso rudimentario y se destaca por la presencia de un anillo nervioso situado en el tercio anterior de parásito. El sistema excretor está compuesto por una glándula y un conducto que finaliza en un poro excretor que se sitúa en la apertura bucal o a nivel del anillo nervioso (Cheng, 1982).

De acuerdo a los criterios morfológicos desarrollados por Shikari (1974), las larvas de *Anisakis* se clasificaron en tipo I, II, III y IV (Tabla 1.1); fue a partir de esta clasificación que se catalogó a las larvas de *A. simplex* como tipo I y *A. physeteris* como tipo II.

Tabla 1.1 Clasificación morfológica de *Anisakis* según Shikari (1974)

	Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV
Ventrículo	Largo	Corto	Corto	Corto
Unión ventrículo-intestino	Oblicua	Horizontal	Horizontal	Horizontal
Porción terminal	Redondeada	Larga y cónica	Redondeada	Corta y cónica
Mucrón	Si	No	No	No
Diente	Corto	Más largo		
Estriaciones en cutícula	Si	No		

Fuente: Abattouy, 2012.

En la actualidad, el reconocimiento morfológico de las distintas larvas L3 genera controversia y dificultad, si bien es cierto es posible determinar *Anisakis* tipo I y II, no ocurre lo mismo cuando se trata de hacer una diferenciación precisa de las especies incluidas en cada morfotipo (Abattouy, 2012).

1.1.3 Ciclo biológico de *Anisakis* spp.

El ciclo biológico característico del género *Anisakis* es muy complejo y en algunos casos aún no está definido completamente, sin embargo, se ha establecido que consta de un estadio de huevo, cuatro estadios larvales y un estadio adulto (Yubero *et al.*, 2004; Mattiucci y Nascetti, 2008). Aunque existen ciertas discrepancias entre los diversos autores que han estudiado el ciclo biológico del parásito, se considera que los hospedadores principales o definitivos de este parásito son los mamíferos marinos (cetáceos y pinnípedos) o aves que se alimentan de peces en cuyo tracto digestivo habita y se reproduce (Koie *et al.*, 1995).

En el caso de *Anisakis simplex*, las larvas adultas se encuentran principalmente en el tracto gastrointestinal de los cetáceos (delfines, marsopas y ballenas), mientras que los adultos de las especies de *Pseudoterranova* spp. y *Phocascaris* spp. viven en pinnípedos (focas, leones marinos y morsas), y en el caso de *Phocascaris* se produce sólo en el hemisferio norte, incluidas las aguas árticas (Mattiucci y Nascetti., 2006). Algunas especies de *Contracaecum* alcanzan la madurez en pinnípedos, mientras que otras maduran en las aves que se alimentan de peces, como cormoranes, pelícanos y garzas. Sin embargo, el rango definitivo de hospedadores de algunas especies de Anisákidos todavía no se conoce completamente (Anderson, 1992; Mattiucci y Nascetti, 2008).

En la Figura 1.3 se presentan los huéspedes definitivos de *Anisakis* spp., mientras que en la Figura 1.4 se esquematiza el ciclo biológico del parásito.

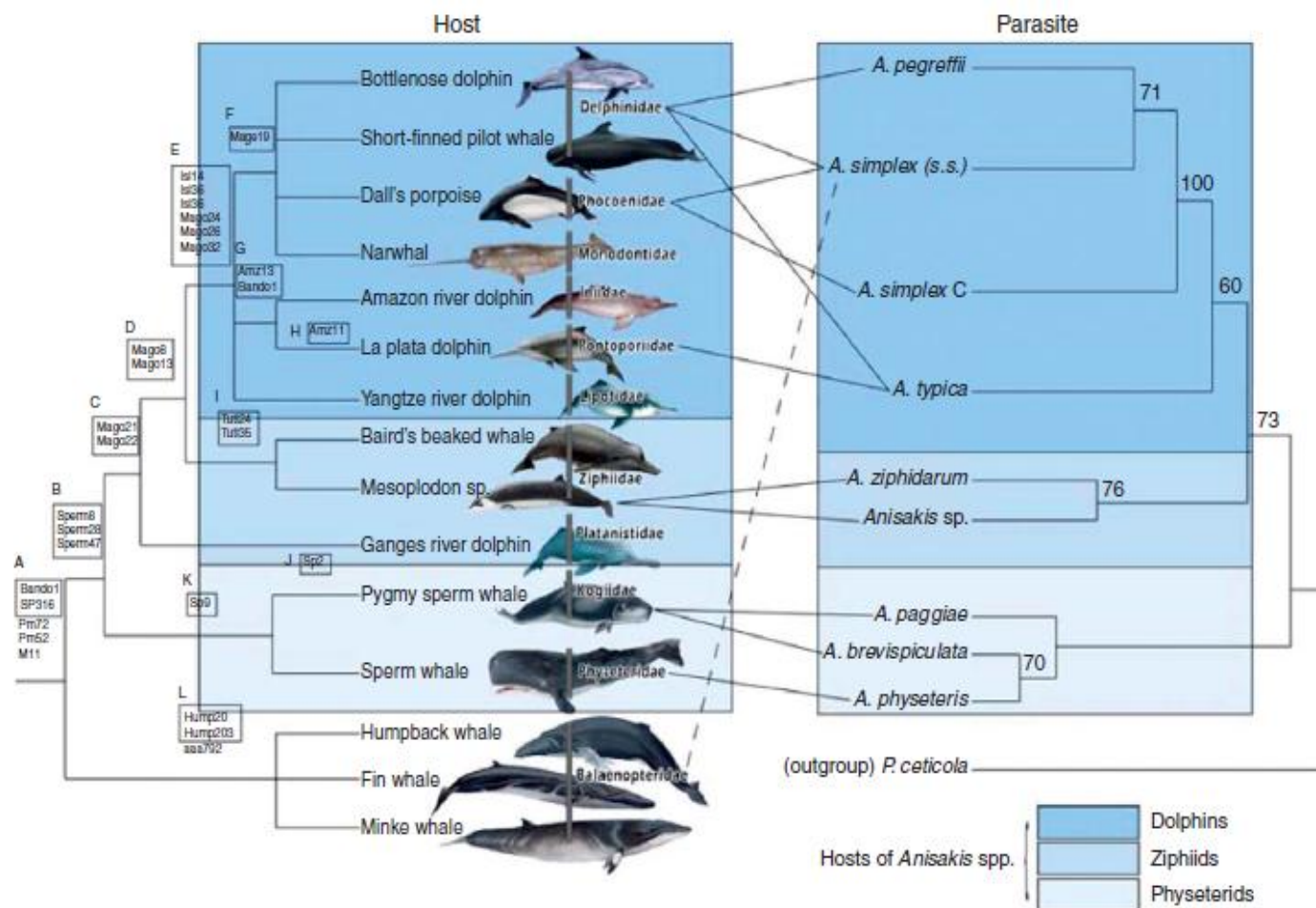


Figura 1.3 Huéspedes definitivos de *Anisakis* spp. (Mattiucci y Nascetti, 2008).

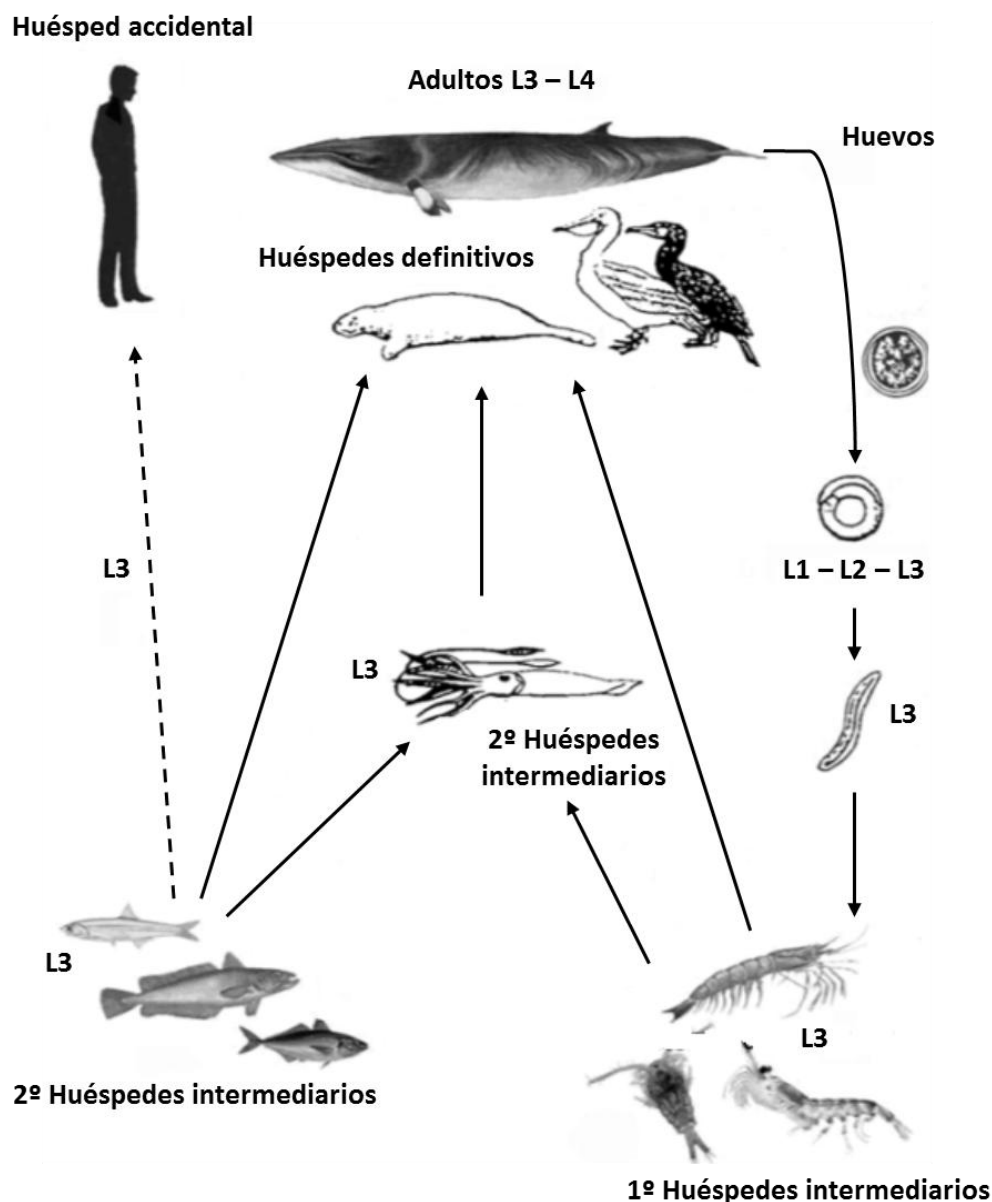


Figura 1.4 Ciclo biológico de *Anisakis* spp. (Tomado de Levsen y Lunestad, 2010).

El ciclo biológico comienza cuando los adultos copulan en el estómago del hospedador definitivo y las hembras adultas depositan sus huevos de unos 50 µm de diámetro. Los huevos del primer estadio larvario (L1) son liberados al mar con las heces del hospedador definitivo, donde embrionarán tras un periodo de incubación (Smith, 1983). La viabilidad de estos huevos en el mar varía en función de la temperatura del agua (Højgaard, 1998). En esta etapa de vida libre en el medio

acuático se producen dos mudas dentro del huevo, de L1 a L2 y de L2 a L3 (Koie *et al.*, 1995). En estas condiciones se libera el tercer estadio larvario (L3) aún envuelto por la cutícula de L2 (Smith, 1971) y que le proporciona la resistencia suficiente para sobrevivir libre en el medio marino hasta por cuatro semanas (13-18°C).

Las larvas permanecen libres hasta que son ingeridas por pequeños crustáceos marinos del plancton (Euphasidae), que actúan como hospedadores intermediarios y en ellos la larva L3 se libera de la cutícula de la larva L2. En este estadio se las considera larvas infectivas. A través de la cadena alimentaria, las larvas L3 son capaces de parasitar distintas especies de peces, anfípodos y decápodos entre otros, en donde pueden penetrar la pared del tracto digestivo y alcanzar la cavidad corporal; en esta etapa no experimentan muda alguna, aunque pueden aumentar de tamaño. Finalmente, cuando los hospedadores definitivos ingieren los peces, zooplancton o cefalópodos infestados, se producen la cuarta y quinta muda, a estadio larvario L4 y nematodo adulto sexualmente maduro, cerrando así el ciclo biológico.

Si pescado crudo o cefalópodos infestados con larvas L3 son ingeridos por los seres humanos, las larvas presentes en la carne producen una enfermedad zoonótica, y los seres humanos actúan entonces como huéspedes accidentales, ya que L3 generalmente no se desarrolla y el ciclo no se puede completar (Audicana y Kennedy, 2008).

1.1.4 Distribución geográfica

Las especies del género *Anisakis* se encuentran distribuidas alrededor de todo el mundo, como se puede observar en la Figura 1.5. Se tratan de especies ecológicamente distintas, con diferente distribución geográfica, suelen tener diferentes hospedadores definitivos y diferentes ciclos de vida (Mattiucci y Nascetti, 2008). Así por ejemplo, en las especies del complejo *A. simplex* (*A. pegreffii*, *A. simplex* s.s. y *A. simplex* C) se ha encontrado que los hospedadores intermediarios son principalmente peces pelágicos, mesopelágicos y demersales. En

las especies *A. ziphidarum* y *A. nascettii*, se ha observado que en la etapa de maduración a adulto se encuentran en los cetáceos de la familia Ziphiidae, mientras que en la etapa larval se presentan en calamares. De forma similar en las especies del complejo *A. physeteridae*, los hospedadores intermediarios son calamares de aguas profundas en lugar de peces (Mattiucci y Nascetti, 2008; Mattiucci *et al.*, 1997; 2009).

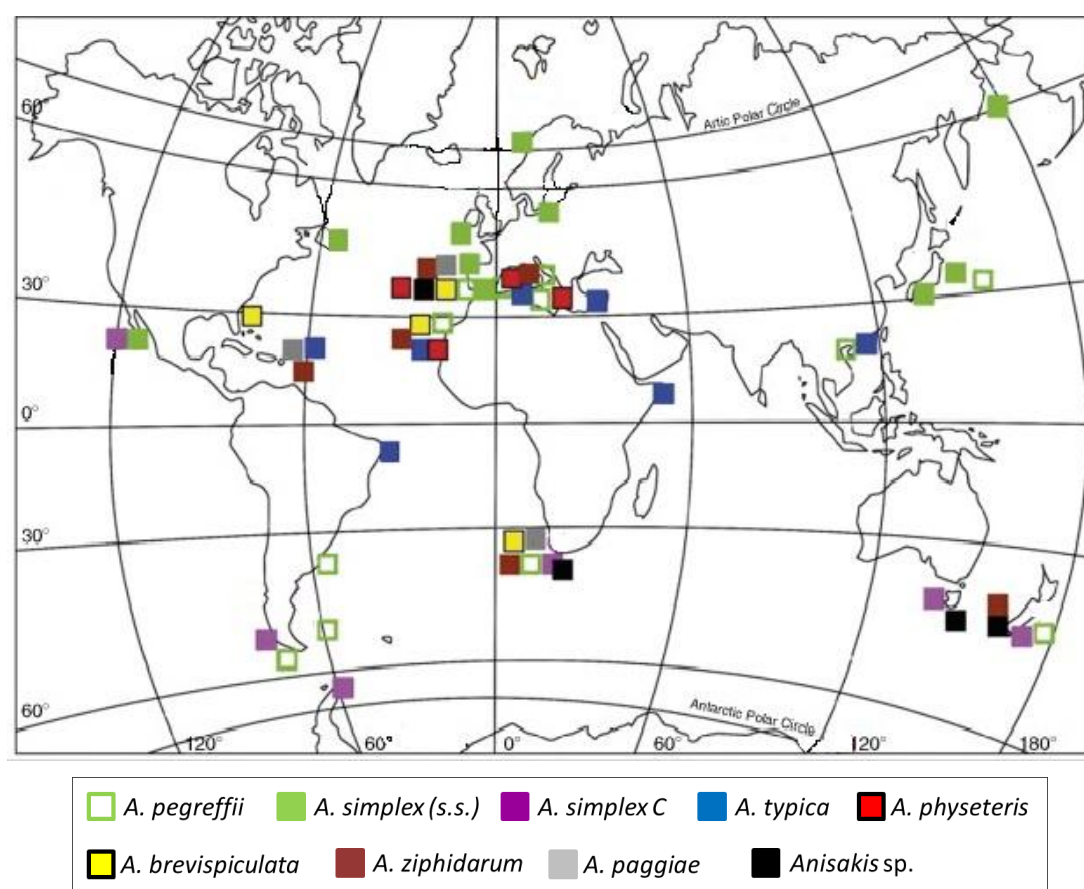


Figura 1.5 Distribución geográfica de *Anisakis* spp. (Mattiucci y Nascetti, 2006; 2008).

Se ha determinado que *A. pegreffii* está principalmente distribuido en el mar mediterráneo y en el hemisferio sur, *A. simplex s.s.* en el Atlántico norte y en el Océano Pacífico, mientras que *A. simplex C* se encuentra en las costas del Pacífico y en el hemisferio sur (Mattiucci *et al.*, 2007; Mattiucci y Nascetti, 2008). Aunque en

general se trata de especies alopátricas, *A. simplex* s.s. y *A. simplex* C se encuentran en simpatría en las costas pacíficas de Canadá, mientras que *A. simplex* C y *A. pegreffii* lo están en el Océano Atlántico sur (Mattiucci y Nascetti, 2008). Las costas de la península Ibérica y los mares de Japón son zonas de simpatría de *A. simplex* y *A. pegreffii* (Abollo *et al.*, 2003; Martín-Sánchez *et al.*, 2005; Umehara *et al.*, 2006; Marques *et al.*, 2006).

1.2 Huéspedes

1.2.1 Principales especies infestadas

Hoy en día se sabe que la mayoría de las especies de consumo que llegan a las lonjas pueden estar infestadas con larvas de Anisákidos. Se han encontrado que más de 160 especies entre peces y cefalópodos están infestadas principalmente por *A. simplex* (Quijada *et al.*, 2005). En la Tabla 1.2 se presenta la relación de las principales especies portadoras de larvas de Anisákidos.

La prevalencia (porcentaje total de individuos muestreados que están infestados) y tasa de infestación (promedio de larvas por pez calculado en el total de peces infestados) de *A. simplex* varía en función de la especie marina, de la zona geográfica, la época del año y las características individuales de cada especie (Petrie *et al.*, 2007), mientras que la prevalencia y abundancia (promedio de larvas por pez, incluidos los peces infestados y no infestados) de larvas L3 de *Anisakis* se ha asociado directamente con la edad y tamaño de los individuos (Abaunza *et al.*, 1995; Mladineo, 2003, Valero *et al.*, 2006; Incorvaia y Hernández, 2006). La especie que presenta la mayor frecuencia de parasitación es la merluza (*Merluccius* spp.) cuya prevalencia varía entre 12 y 100%, seguida de la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*) con un 94%, mientras que en el jurel (*Trachurus trachurus*) oscila entre 0 y 76% (Osanz Mur, 2001; Cuellar *et al.*, 1991; Silva y Eiras, 2003; Tejada *et al.*, en prensa) (Tabla 1.3).

Tabla 1.2 Principales especies portadoras de larvas de Anisákidos

Orden	Familia	Especie
Gadiformes	<i>Merlucciidae</i>	Merluza, pescadilla (<i>Merluccius</i> spp.)
	<i>Gadidae</i>	Bacalao (<i>Gadus morhua</i>), merlán, liba (<i>Merlangius merlangus</i>), bacaladilla (<i>Micromesistius poutassou</i>), abadejo (<i>Pollachius pollachius</i>), carbonero (<i>Pollachius virens</i>), faneca (<i>Trisopterus luscus</i>), capellán (<i>Trisopterus minutus</i>), brótola (<i>Phycis</i> spp.), maruca (<i>Molva molva</i>), bertorella (<i>Gaidropsarus mediterraneus</i>), palo (<i>Molva dipterygia</i>)
Perciformes	<i>Scombridae</i>	Caballa, verdel (<i>Scomber scombrus</i>)
	<i>Serranidae</i>	Cabra (<i>Serranus cabrilla</i>), serrano (<i>Serranus scriba</i>)
	<i>Mullidae</i>	Salmonete de fango (<i>Mullus barbatus</i>), salmonete de roca (<i>Mullus surmuletus</i>)
	<i>Sparidae</i>	Besugo (<i>Pagellus cantabricus</i>), pargo (<i>Pagrus pagrus</i>), boga de mar (<i>Boops boops</i>)
	<i>Thunnidae</i>	Atún rojo (<i>Thunnus thynnus</i>), melva (<i>Auxis thazard</i>)
	<i>Carangidae</i>	Jurel, chicharro (<i>Trachurus trachurus</i>), palometa blanca (<i>Trachinotus ovatus</i>)
	<i>Bramidae</i>	Palometa o Japuta (<i>Brama brama</i>)
	<i>Trichiuridae</i>	Pez sable (<i>Trichiurus lepturus</i>)
Clupeiformes	<i>Salmonidae</i>	Salmón (<i>Salmo salar</i>)
	<i>Clupeidae</i>	Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>), arenque (<i>Clupea harengus</i>)
	<i>Engraulidae</i>	Boquerón (<i>Engraulis encrasicolus</i>)
Pleuronectiformes	<i>Pleuronectidae</i>	Platija (<i>Platichthys flesus</i>), solla de altura (<i>Pleuronectes platessa</i>), fletan (<i>Hippoglossoides</i> spp.)
	<i>Soleidae</i>	Lenguado (<i>Solea</i> spp.)
	<i>Scophthalmidae</i>	Rodaballo (<i>Psetta maximus</i>), gallo (<i>Lepidorhombus</i> spp.)
Escorpeniformes	<i>Scorpaenidae</i>	Gallineta (<i>Helicolenus dactylopterus</i>), cabracho (<i>Scorpaena scrofa</i>)
	<i>Triglidae</i>	Rubio (<i>Trigloporus lastoviza</i>)
Bericiformes	<i>Berycidae</i>	Palometa roja (<i>Beryx decadactylus</i>)
Lophiiformes	<i>Lophiidae</i>	Rape (<i>Lophius piscatorius</i>)
Anguilliformes	<i>Congridae</i>	Congrio (<i>Conger conger</i>)
Dibranchia	<i>Loliginidae</i>	Calamar (<i>Loligo vulgaris</i>)
	<i>Octopodidae</i>	Pulpo (<i>Octopus vulgaris</i>)
	<i>Sepiidae</i>	Sepia (<i>Sepia</i> spp.)

Fuente: EFSA (2010)

Tabla 1.3 Distribución geográfica y prevalencia de especies portadoras de *A. simplex*

Área	Especie	Prevalencia	Referencia
Mar de Barents	Bacalao (<i>Gadus morhua</i>)	96%	Aspholm, 1995
Costa portuguesa	Jurel (<i>Trachurus trachurus</i>)	76%	Silva y Eiras, 2003
	Caballa (<i>Scomber scombrus</i>)	96%	
	Merluza (<i>Merluccius</i> spp.)	100%	
	Bacaladilla (<i>Micromesistius poutassou</i>)	94%	
Madeira, Portugal	Caballa (<i>Scomber japonicus</i>)	70%	Costa <i>et al.</i> , 2003
Costa Mediterránea de España	Bacaladilla (<i>Micromesistius poutassou</i>) (17-24 cm)	12%	Valero <i>et al.</i> , 2000
	Bacaladilla (<i>Micromesistius poutassou</i>) (>25 cm)	17%	
	Merluza (<i>Merluccius</i> spp.)	41-100%	Valero <i>et al.</i> , 2006
			Ceballos-Mendiola <i>et al.</i> , 2010
Mar Mediterráneo (Italia)	Jurel de altura (<i>Trachurus picturatus</i>)	80-100%	Manfredi <i>et al.</i> , 2000
Galicia	Merluza (<i>Merluccius</i> spp.)	100%	Ceballos-Mendiola <i>et al.</i> , 2010
	Bacaladilla (<i>Micromesistius poutassou</i>)		
	Maruca (<i>Molva molva</i>)		Abollo <i>et al.</i> , 2001
	Rape (<i>Lophius piscatorius</i>)	>70%	
	Caballa (<i>Scomber scombrus</i>)		
	Chopa (<i>Spondyllosoma cantharus</i>)		
Francia	Bacalao (<i>Gadus morhua</i>)	1,97%	Angot, 1993
	Bacalada (<i>Merlangius merlangus</i>)	3,55%	
Costa Norte de Marruecos	Estornino (<i>Scomber japonicus</i>)	65,4%	Abattouy <i>et al.</i> , 2011
	Jurel (<i>Trachurus trachurus</i>)	54,9%	Abattouy, 2012
Costa Pacífico Sur (Perú)	Calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>)	17,7%	Céspedes <i>et al.</i> , 2011

1.2.2 Localización en peces y cefalópodos

En la mayoría de las especies, las larvas vivas se presentan enrolladas en forma de espiral plano bajo el tejido conectivo, y pueden ubicarse en la submucosa del tubo digestivo, en la cavidad abdominal, en la superficie hepática, en las gónadas, entre los mesenterios (Smith y Wootten, 1978) y en la musculatura (Ruíz-Valero *et al.*, 1992; Abollo *et al.*, 2001; Tejada, 2009).

Se han encontrado estudios contradictorios sobre la posible migración de las larvas de *Anisakis* hacia el músculo una vez que el pescado ha sido capturado. Al respecto, Van Thiel (1960) y Smith y Wootten (1975) sugieren que esta migración ocurre cuando el pescado capturado es mantenido en hielo por más de 48 horas. Sin embargo, Roepstorff *et al.* (1993) no encontraron evidencias de que tal migración esté relacionada con las condiciones de almacenamiento *post-mortem*. Smith (1984) por su parte afirma que esta migración *post-mortem* sólo se observa en las especies de pescado grasas como el arenque o jurel.

Quiazon *et al.* (2011) mediante infecciones experimentales en trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) y en falso halibut del Japón (*Paralichthys olivaceus*), observaron que la presencia de *Anisakis* en la musculatura de los peces, no sólo obedece al tipo de pescado sino también a la especie de *Anisakis* y al tiempo que transcurre desde que se infecta el pez. Otros estudios indican que la localización preferente de las larvas en peces y cefalópodos puede estar ligada a los hábitos alimenticios del hospedador. En peces que se alimentan principalmente de eufáusidos, como la bacaladilla (*Micromesistius poutassou*), arenque (*Clupea harengus*) o caballa (*Scomber japonicus*) se ubica en la cavidad abdominal y vísceras (Køie *et al.*, 1995; Abollo *et al.*, 2001; Valero *et al.*, 2006); mientras que en peces piscívoros como el abadejo (*Pollachius pollachius*), bacalao (*Gadus morhua*), merluza (*Merluccius* spp.) o merlán (*Merlangius merlangus*) suelen ubicarse también en la musculatura hipoaxial que rodea la cavidad abdominal (Quijada *et al.*, 2005; Petrie *et al.*, 2007; Solas *et al.*, 2008). En el caso de calamares, las larvas se ubican en la pared externa del estómago y en la musculatura del manto (Pardo-Gandarillas *et al.*, 2009) (Figura 1.6).



Figura 1.6 Larvas de *A. simplex* en merluza (*Merluccius merluccius*) y en manto de calamar gigante (*Dosidicus gigas*).

Por otro lado, el número de larvas en la musculatura y su distribución difieren con la especie de pescado y con los caladeros, mientras que la distribución de las larvas en el músculo y las vísceras depende de la especie de pescado. Al respecto, estudios efectuados en especies capturadas en el Atlántico norte, nos indican que entre el 86% y 98% de las larvas se localizaban en la cavidad abdominal o vísceras y el resto en musculatura, en especial musculatura ventral (Karl, 2008; Tejada *et al.*, en prensa). Mientras que en algunas especies de salmón del Pacífico se detecta más abundancia en *A. simplex* en la musculatura (87%), con ubicación preferente la musculatura abdominal (Deadorff y Kent, 1989; Karl *et al.*, 2011). En especies de calamar gigante capturados en las costas del Pacífico sur, se han detectado la presencia de larvas de *Anisakis* en un 57%, todas ellas localizadas en la musculatura del manto (Céspedes *et al.*, 2011).

1.3 Problemática causada por Anisákidos

Tras la detección del primer caso de infestación humana en los años 60 asociado al consumo de pescados crudos (Van Thiel *et al.*, 1962), *Anisakis* es considerado actualmente un problema de salud pública. El sector y las autoridades sanitarias son conscientes desde hace décadas de los problemas relacionados con la

parasitación de pescado por Anisákidos ya que afectan tanto al valor comercial de las capturas como a la salud de los consumidores. Aunque hace décadas la infestación de pescado por Anisákidos se consideraba circunscrita a determinadas zonas de captura y se asociaba principalmente a especies como bacalao (*Gadus morhua*) (infestación por *Pseudoterranova decipiens*) o arenque (*Clupea harengus*) (por *A. simplex*), la distribución de las distintas especies de Anisákidos y especialmente de *A. simplex* es prácticamente universal.

En la actualidad la presencia de larvas L3 se detecta en la mayoría de las especies marinas de pescado que se consumen en España, siendo su prevalencia entre los individuos que llegan a las lonjas entre un 25% y un 80% y con altas tasas de infestación en algunas especies. En merluzas (*Merluccius merluccius*) capturadas en el Atlántico Norte se ha detectado que la prevalencia de larvas L3 de *A. simplex* se daba en el 100% de los individuos, habiendo encontrado ejemplares con más de 1500 larvas en cavidad intestinal y más de 200 larvas encapsuladas en la musculatura ventral inmediatamente después de capturadas (Petri *et al.*, 2007; EFSA, 2010; Ceballos-Mendiola *et al.*, 2010; Tejada *et al.*, en prensa).

El término Anisakiosis o Anisakiasis se refiere a la patología (parasitismo o alergia) producida por *A. simplex* mientras que Anisakidosis se refiere a las enfermedades producidas por diferentes géneros de la familia Anisakidae (*A. simplex*, *Pseudoterranova decipiens* y *Contracaecum osculatum*). Aunque el problema de parasitación humana por ingesta de la larva viva se conoce desde hace décadas en países con tradición de consumo de pescado crudo o con tratamientos culinarios que no producen la muerte de la larva (Van Thiel *et al.*, 1962; Pinkus y Coodlige, 1975; Paltridge, 1984; Ikeda *et al.*, 1989; Ishikura *et al.*, 1993; Nagasawa y Moravec, 1995; Ward *et al.*, 1997; Noh *et al.*, 2003), las reacciones alérgicas asociadas al consumo de pescado infestado con L3 se han descrito en la década de los 90 del pasado siglo (Kasuya *et al.* 1990; Audicana *et al.*, 1995).

Los síntomas agudos por la ingestión del parásito vivo son principalmente gastrointestinales como vómitos, náuseas, dolor abdominal, diarrea, edema, fiebre

ligera entre otros, que pueden ser de distinta intensidad y presentarse transcurridas 24 horas desde el consumo de pescado, lo que en algunos casos dificulta el diagnóstico (González Quijada *et al.*, 2005). Los síntomas crónicos se producen cuando la larva lleva tiempo en la mucosa lesionada produciendo en la mucosa abscesos y granulomas que se manifiestan como molestias epigástricas que pueden persistir durante meses o incluso años (Audicana *et al.*, 2002; Audicana y Kennedy, 2008).

Otra patología asociada a la exposición al parásito es una respuesta de hipersensibilidad mediada por Inmunoglobulina E (IgE) con síntomas como angioedema, urticaria y anafilaxia (Daschner *et al.*, 2005; Audicana y Kennedy, 2008). Se considera que es necesaria una infestación inicial de la mucosa gástrica o intestinal con la larva L3 viva para que se sintetice IgE y se originen los síntomas alérgicos (Moneo *et al.*, 2000b) ya que las proteasas e inhibidores de proteasas que excreta-secreta la larva para invadir al huésped pueden actuar como alérgenos.

Cada vez son más numerosas las evidencias de que hay pacientes sensibilizados a *A. simplex* que muestran síntomas después de consumir pescado correctamente congelado, cocinado o incluso en conserva en los que la larva estaría muerta (Montoro *et al.*, 1997; Audicana *et al.*, 2002; Moneo *et al.*, 2005; AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium, 2011). Estudios que muestran que determinadas proteínas de *Anisakis* mantienen sus propiedades alergénicas después de un tratamiento térmico, provienen de su detección por inmunodetección con sueros de pacientes (Audicana *et al.*, 1997; Caballero y Moneo, 2004; Moneo *et al.*, 2005) y de pruebas cutáneas positivas en pacientes sensibilizados (Ventura *et al.*, 2008). Los estudios epidemiológicos sobre la incidencia del problema en la población española concluyen que la Anisakiosis es una de las afecciones con causa nematológica de mayor prevalencia en España y que varía según las regiones entre un 0,43% hasta un 22% (Puente *et al.*, 2008).

La importancia creciente que suscita en el consumidor y en el sector pesquero la infestación de peces por *Anisakis* y el diagnóstico cada vez más frecuente de

Anisakidosis en humanos en distintos países, se aprecia como un problema de seguridad alimentaria y se describe a *A. simplex* como responsable del 33% de las alertas por riesgo biológico específico (Kleter *et al.*, 2007).

Desde el punto de vista tecnológico, para producir la muerte de las larvas se recomienda la aplicación de altas temperaturas ($\geq 60^{\circ}\text{C}$ en el centro térmico, ≥ 10 min) o bajas temperaturas en el caso de pescados o productos de la pesca que se van a consumir crudos o sometidos a tratamientos tecnológicos o culinarios que no producen la muerte de la larva; aunque las condiciones de tiempo-temperatura de congelación del pescado recomendadas por la UE y FDA difieren (Reglamentos 853/2004, 854/2004 y FDA, 2011). En España las recomendaciones de la UE se han recogido en el Real Decreto 1420/2006 a partir de las publicadas en año 2004, en las que se indica que los operadores de empresas alimentarias deben congelar el pescado que se va a consumir crudo o poco cocinado y se especifica que la temperatura en todos los puntos del pescado tiene que ser como máximo -20°C durante al menos 24 horas para producir la muerte de las larvas. En la actualidad la UE ha modificado algunos requisitos del Reglamento 853/2004 (Reglamento 1276/2011).

Sin embargo, aunque se produzca la muerte de la larva por aplicación de distintos tratamientos que evitarían la infestación en humanos, no se evita la aparición de alergia en la población previamente sensibilizada a ciertos alérgenos de *Anisakis* debido a su gran resistencia al calor (Moneo *et al.*, 2000a; Kobayashi *et al.*, 2007; Rodríguez Pérez *et al.*, 2008; Vidaček *et al.*, 2009b; 2010; 2011) y a pepsina (Caballero y Moneo, 2004; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007), ya que se ha detectado *Anisakis* 4 después de aplicar a pescado infestado o larvas sometidas a tratamientos tecnológicos individuales o sucesivos que producen la muerte de la larva e incluso en condiciones de digestión con pepsina más extremas que las que se dan en el aparato digestivo humano (Tejada *et al.*, 2007; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; Vidaček *et al.*, 2009b).

Por lo tanto, las larvas de *Anisakis* pueden ser una fuente alergénica en alimentos que se consideran seguros por el tratamiento tecnológico recibido que produce la muerte

de las larvas, e incluso en productos de origen no marino como la carne de pollo, teniendo como origen de contaminación el pienso con componentes de *Anisakis* con las que probablemente las aves fueron alimentadas (Armentia *et al.*, 2006). De hecho, se estima que los *Anisakis* constituyen una fuente de alérgenos ocultos en reacciones alérgicas alimentarias en nuestra área geográfica (Añíbarro *et al.*, 2007).

1.4 Legislación

1.4.1 Europea

Como consecuencia de los casos crecientes de anisakiasis la Unión Europea a partir del año 1991, comenzó a emitir una serie de normativas específicas para reducir esta enfermedad. La última modificación realizó en diciembre del 2011.

- a. **Directiva 91/493/CEE** del Consejo de 22 de Julio de 1991 por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. Comunidades Europeas (DOCE 268 de 24/09/91).
- b. **Decisión 93/140/CEE** de la Comisión de 19 de Enero de 1993, por la que se establecen las modalidades de control visual para detectar parásitos en los productos de la pesca. Comunidades Europeas (DOCE 56 de 09/03/93).
- c. **Reglamento 853/2004** del Parlamento Europeo y del Consejo 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Unión Europea (DOUE 139 de 30/04/2004).
- d. **Reglamento 854/2004** del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano. Unión Europea (DOUE 139 de 30/04/2004).

- e. **Reglamento 1276/2011** de la Comisión de 8 de diciembre de 2011 por el que se modifica el Anexo III del Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente al tratamiento para matar parásitos viables en los productos de la pesca destinados al consumo humano. Unión Europea (DOUE 327, 09-1-11).

Algunas de las especificaciones que recogen las normativas (a-d) son las siguientes:

- Los operadores de la empresa alimentaria deben garantizar que los productos de la pesca se hayan sometido a un examen visual con el fin de detectar los parásitos visibles antes de ser puestos en el mercado.
- No podrán comercializarse en el mercado para consumo humano, los productos de la pesca que estén claramente infestados con parásitos.
- Los operadores de la empresa alimentaria deben garantizar que los productos destinados a consumir crudos o prácticamente crudos se sometan a un tratamiento de congelación ($\leq -20^{\circ}\text{C}$ en el interior del pescado, durante al menos 24 horas). De forma similar, los productos en escabeche (cuando este proceso no baste para matar las larvas) y las especies de arenque, caballa, espadín y salmón salvaje del Atlántico o del Pacífico, cuando se traten mediante ahumado en frío ($\leq 60^{\circ}\text{C}$) también deben someterse a congelación.

Con el fin de incluir los nuevos puntos de vista científicos recogidos en el dictamen de la EFSA (2010), se ha procedido a modificar los requisitos establecidos en el anexo III, sección VIII, capítulo III, parte D, del Reglamento 853/2004. Las modificaciones realizadas se mencionan a continuación.

- Los operadores de empresas alimentarias que pongan en el mercado productos de la pesca consumidos crudos o escabechados, en salazón o sometidos a cualquier otro tratamiento si este es insuficiente para matar al parásito viable, deben garantizar que la materia prima o el producto acabado son sometidos a tratamiento por congelación para matar los parásitos viables.

- Los parásitos distintos a los trematodos, deben someterse a tratamiento por congelación, en la totalidad del producto, a una temperatura $\leq -20^{\circ}\text{C}$ durante al menos 24 horas, o -35°C durante al menos 15 horas.
- No hace falta que los operadores de empresas alimentarias lleven a cabo el tratamiento de congelación en aquellos productos que han sido sometidos a:
 - tratamiento térmico que mate a parásitos viables ($\geq 60^{\circ}\text{C}$, 1 minuto);
 - congelación que mate a parásitos viables;
 - que procedan de capturas salvajes a condición de que los datos epidemiológicos del caladero demuestren ausencia de parásitos y que las autoridades competentes lo autoricen;
 - que procedan de la acuicultura, alimentados con dieta libre de parásitos viables, comprobado por la empresa alimentaria y autorizado por la autoridad competente.
- Los productos sometidos a congelación deben ir acompañados de un documento del operador de la empresa alimentaria que especifique el tipo de proceso al que han sido sometidos los productos.
- A través de un documento informativo, se debe garantizar que los productos de la pesca que proceden de un caladero o de una piscifactoría libre de parásitos viables y que reúnen las condiciones necesarias para su comercialización.

1.4.2 Española

- a. ***Real Decreto 1437/92***, de 27 de noviembre, por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura (BOE 11, 13-01-93).

- b. **Real Decreto 1420/2006**, del 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades (BOE 302, 19-12-06).

Referente a los parásitos, se determina que, tanto los pescados, como los productos derivados del pescado, habrán de pasar un control visual para detectar los posibles parásitos visibles y desecharlos. Por otra parte, se prohíbe la venta de los pescados o las partes de éstos que estén altamente parasitados. Finalmente, son los barcos factoría y las industrias dedicadas a la elaboración y preparación de los productos de la pesca los responsables de realizar el control para garantizar el cumplimiento de dicha ley. En el Decreto del año 2006 se fija la obligatoriedad para los establecimientos que sirven comida, de someter todos los pescados que se vayan a servir en crudo o casi crudos a un ciclo de congelación de 24 h a una temperatura igual o inferior a -20°C. Esto incluye productos de la pesca que han sido sometidos a un proceso de ahumado en frío en el que la temperatura central del producto no ha sobrepasado los 60°C. Igualmente estarán obligados a garantizar la congelación en las mismas condiciones si se trata de productos de la pesca en escabeche o salados, cuando este proceso no baste para destruir las larvas.

1.5 Medidas para prevenir la presencia de larvas de *Anisakis*

La Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN, 2011) ha propuesto una serie de pautas para la reducción del riesgo asociado con la contaminación de los pescados con larvas de *Anisakis*, indicando que dichas medidas deben contemplarse en todos los eslabones de la cadena producción-consumo, es decir, tanto a nivel de producción primaria (áreas, tipos de capturas y prácticas de capturas), como en la manipulación a bordo o en tierra.

1.5.1 Sector extractivo

En la pesca extractiva para evitar la comercialización de pescados con alto grado de infestación, se ha recomendado no faenar en zonas muy contaminadas con Anisákidos (Huss, 1993), así como capturar determinadas especies o determinadas talla de una especie (WHO, 1995). Probablemente es la medida más difícil de seguir y controlar, sin embargo, estas medidas reducirían la presencia de larvas de *Anisakis* en pescado sin eviscerar.

Otro grupo de medidas, están dirigidas a prevenir la presencia de larvas en el pescado que se va a comercializar. En este sentido se recomienda:

- Eviscerar el pescado en alta mar inmediatamente después de la su captura, a fin de evitar la migración hasta la musculatura (Smith y Wootten 1984; Roepstorff *et al.*, 1993).
- Descartar la musculatura hipoaxial ya que se a comprobado que esta zona es propensa a contener la mayor cantidad de larvas de *A. simplex* (Jemmi *et al.*, 2000; FDA, 2001; Huss *et al.*, 2003; Tejada *et al.*, en prensa).
- Retirar la partidas muy parasitadas (EFSA, 2010).
- La congelación rápida en el buque es un método eficaz de producir la muerte de las larvas de *A. simplex*. Sin embargo, la congelación no destruye la capacidad de producir alergia en el consumidor debido a los antígenos presentes en la larva o en el músculo (Solas *et al.*, 2008; 2009; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010).

Para que la eliminación a bordo de vísceras sea efectiva a nivel integral, es imprescindible someterlas a un tratamiento para producir la muerte de las larvas y que no vuelvan a ingresar a la cadena trófica. Aunque existen muchos trabajos orientados a tratar a bordo las vísceras para producir la muerte de las larvas, la mayoría no son actualmente utilizados por la flota.

1.5.2 Industria transformadora

En la industria transformadora, las directrices están enfocadas en la detección de las larvas por distintos métodos, con eliminación de las larvas visibles de las zonas infestadas. Los problemas de la infestación de filetes o zonas donde las larvas sean visibles difieren, y por lo tanto el perjuicio causado está en función de la tasa de infestación, de la localización de las larvas pero sobretodo del valor comercial de la zona infestada.

Los métodos empleados en la industria son no destructivos y automatizados para que puedan ser aplicados a las líneas de producción industrial. Comercialmente la forma de detectar la presencia de parásitos es mediante la inspección visual y la transiluminación. Actualmente, la industria esta haciendo los mayores esfuerzos en desarrollar métodos y equipos para facilitar la detección de las larvas en las líneas de producción.

1.5.3 Acuicultura

Se considera que en las especies cultivadas con pienso seco el riesgo de infestación con *Anisakis* es casi inexistente, debido principalmente a las condiciones controladas de cultivo (Tejada y López Ramon, 2012). Sin embargo, se han encontrado en algunos casos aislados de Anisákidos en vísceras y en músculo de especies cultivadas (Shih *et al.*, 2010). Las vías de transmisión pueden deberse a la presencia en el medio marino de hospedadores intermediarios (crustáceos anfípodos) o a través de la alimentación de los peces cultivados con productos contaminados (Rückert *et al.*, 2008). En tal sentido, se recomienda evitar en lo posible la presencia de mamíferos marinos y aves ictiófagas y evitar que la alimentación de los peces cultivados se realice con productos contaminados con larvas vivas.

Por otro lado, el Reglamento 1276/2011 especifica que las especies procedentes de la acuicultura, criados a partir de embriones y alimentados exclusivamente con una dieta libre de parásitos viables, no tendrán que ser sometidos a congelación, siempre y cuando la empresa alimentaria se encuentre autorizada para tal fin. En la actualidad

no existen estudios publicados que determinen si existe riesgo de consumo de pescados alimentados con piensos con alérgenos.

1.6 Técnicas de detección de larvas de *Anisakis*

Actualmente, existe una variedad de métodos que permiten, determinar la presencia de *Anisakis* en el músculo o en las vísceras del pescado, sin embargo, la mayoría de ellos exigen la destrucción la pieza a examinar. Es necesario tener en cuenta que la muerte de las larvas evita la infestación del consumidor final, pero no evita la posibilidad de que se desarrollen reacciones alérgicas en individuos previamente sensibilizados (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010).

1.6.1 Viabilidad de las larvas

1.6.1.1 Movilidad

Una larva es considerada viable cuando presenta movimientos espontáneos o estimulados al tocar las larvas, sin dañarlas, con una aguja o pinzas. Se considera positiva si existe reacción al contacto.

1.6.1.2 Tinción con colorantes

Este método es utilizado para distinguir entre larvas vivas y muertas en pescado infestado, ya que las larvas al estar muertas se tiñen más intensamente (Leinemann y Karl, 1988). Los colorantes más eficaces han sido la safranina y el verde brillante (Vidaček *et al.*, 2010) que se utilizan en condiciones que simulan la digestión gástrica (Astwood *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando las larvas se someten a condiciones tales como altas temperaturas ($\geq 60^{\circ}\text{C}$) que pueden producir alteraciones en la cutícula, se puede modificar la resistencia a la pepsina y detectarse en el medio fragmentos de las larvas e incluso pueden digerirse completamente no apreciándose visualmente en el medio (Vidaček *et al.*, 2010).

1.6.2 Detección de las larvas

Comercialmente la forma de detectar la presencia de parásitos es mediante la inspección visual y la transiluminación. La desventaja de estos métodos es la baja eficiencia en la detección en condiciones industriales y de aquí un gran número de parásitos son dejados en el músculo y potencialmente pueden ser ingeridos por el consumidor (Bublitz y Choudhury, 1992; Levsen *et al.*, 2005).

Aunque en esta fase, la evisceración, la inspección visual, la eliminación física de las larvas y la exclusión de la musculatura ventral (hipoaxial) pueden reducir el peligro asociado a *Anisakis*, no lo eliminan ni lo reducen hasta un nivel aceptable. Por ello, es necesario congelar previamente los productos que se van a consumir crudos o poco procesados (ahumado en frío, escabechado o marinado) (AESAN, 2011).

Un resumen de los métodos más comunes se recoge en el informe de EFSA (2010). A continuación se describe cada uno de ellos.

1.6.2.1 Examen visual

Es el método más sencillo para detectar larvas de *Anisakis*. Se trata de un método no destructivo que no discrimina entre larvas vivas y muertas. Consiste en la búsqueda de las larvas en la superficie de las vísceras y en el músculo del pescado (Osanz Mur, 2001).

Se ha demostrado que este método permite determinar entre 45-83% de las larvas ubicadas en el músculo de algunos tipos de pescado (Huang, 1990). Se emplea sólo para filetes o pescados pequeños, no es aconsejable para examinar piezas de gran tamaño, pigmentadas o con piel. Actualmente, es uno de los métodos utilizados en la industria procesadora.

1.6.2.2 Transiluminación o Candling

Este método se utiliza para detectar parásitos en filetes sin piel, los cuales se observan sobre una superficie traslúcida iluminada con luz blanca por la zona inferior (Karl y Leinemann, 1993). Se utiliza en la industria procesadora para detectar larvas

que pueden estar localizadas en el interior del músculo hasta una profundidad de 5-6 mm; pero si el espesor del filete es de 1 cm tan sólo se detectan las larvas de *Pseudoterranova decipiens* (Huang, 1990).

El método es manual aunque se considera que se pueden observar hasta 300 filetes por hora, debido a la fatiga ocular de los operarios la eficacia decae (Wootten y Cann, 2001). Al tratarse de un método no automatizado, en la industria es considerado como un cuello de botella ya que reduce la velocidad de procesado y retrasa la producción; asimismo, puede dar lugar al crecimiento de microorganismos y a una degradación enzimática del producto (Bublitz y Choudhury, 1992).

Al igual que el examen visual, se trata de un método no destructivo y que no discrimina entre larvas vivas y muertas. Se considera que esta técnica tiene baja eficacia y solamente se detecta entre el 7 y 10% de las larvas presentes en los filetes infestados (Osanz Mur, 2001; Levsen *et al.*, 2005).

1.6.2.3 Detección por luz ultravioleta

Este método es muy similar al anterior, salvo que en lugar de utilizar luz blanca se utiliza luz ultravioleta a una longitud de onda de 366 nm (Pippy, 1970). El procedimiento consiste en hacer incidir luz ultravioleta a unos 10 cm sobre la superficie del pescado examinándolo por ambos lados. Se pueden distinguir larvas de *Anisakis* y *Pseudoterranova* que se muestran de un color fluorescente azulado, y las *Contracaecum* que aparecen en amarillo. Generalmente no es un método destructivo, es relativamente rápido y adecuado para visualizar y extraer nematodos del pescado con carne pigmentada. Sin embargo, para una mayor eficacia requiere que se congele y descongele la muestra.

Cuando las larvas se someten a un proceso de congelación, la emisión de fluorescencia es intensa mientras que en larvas vivas por lo general no hay emisión de fluorescencia a no ser que hayan sido sometidas a tratamientos posteriores (Tejada *et al.*, 2006b). La muerte de la larva no coincide en muchos casos con la emisión de fluorescencia por lo que se considera que es un método inadecuado para

discriminar entre larvas vivas y muertas (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; Solas *et al.*, 2008; Vidaček *et al.*, 2009a; 2009b; 2010).

1.6.2.4 Método de presión y fluorescencia

Este método elimina el problema del grosor de las piezas cuando son evaluadas por emisión de fluorescencia. Los filetes son sometidos a una presión previa con el fin de conseguir un espesor de 1-2 mm, para lo cual los filetes dorsales y ventrales sin piel se introducen individualmente en bolsas de plástico transparente, se someten a presión con prensa hidráulica, se congelan a $\leq -18^{\circ}\text{C}$ durante un periodo igual o superior a 12 h y posteriormente se someten a inspección visual bajo una fuente de luz UV a 366 nm (Karl y Leinemann, 1993).

El método además de permitir la cuantificación de las larvas, permite conocer su ubicación en el filete. Sin embargo, se trata de un método destructivo y al realizarse en productos congelados no discrimina entre larvas vivas y muertas.

1.6.2.5 Digestión con pepsina

Se trata de un método destructivo utilizado para el estudio de prevalencia, abundancia e intensidad de la infestación de un lote determinado y no es recomendado para inspecciones industriales. La técnica consiste en reproducir las condiciones físico-químicas del estómago de los mamíferos y someter al músculo a una solución de pepsina y ácido clorhídrico a 37°C (Leinemann y Karl, 1988; EFSA, 2010; CODEX, 2004), y de esta forma separar las larvas del tejido muscular o vísceras en el que se encuentran alojadas.

La cutícula de las larvas es estable en estas condiciones de digestión y el método permite distinguir entre larvas vivas y muertas. Sin embargo, si la cutícula se encuentra alterada por algún proceso previo, puede dejar de ser estable y las larvas se pueden digerir, por lo que en estudios con larvas tratadas la recuperación puede ser menor de la esperada (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; Solas *et al.*, 2009).

1.6.2.6 Espectroscopia de imagen

Se trata de un método de detección instrumental no destructivo, basado en el espectro de imagen del nematodo y la cuantificación del contraste. El espectro de imagen varía en función de la longitud de onda aplicada y se correlaciona con las propiedades de absorción de la larva. Al respecto, se han identificado componentes de la larva que absorben la luz en la región de 400 a 600 nm (Stormo *et al.*, 2004).

Se utiliza de preferencia en filetes sin piel y detecta las larvas hasta una profundidad de 8-9 mm (Heia *et al.*, 2007). La precisión del método depende del nivel de contraste, no necesita contacto directo con el producto y se puede aplicar para trabajar en líneas de producción en tiempo real lo que permite tomar decisiones sobre el procesado posterior en función de la zona infestada.

1.6.2.7 Detección electromagnética

El método se basa en la diferencia de la conductividad entre el músculo del pescado y las larvas. Para la detección se utiliza un magnetómetro SQUID (Superconducting Quantum Interference Device magnetometer), que registra de forma automatizada las perturbaciones en el campo magnético y transfiere una señal que luego es amplificada y almacenada en formato digital (Choudhury *et al.*, 2002). Con este método se puede determinar la orientación y posición de las larvas o la presencia de espinas. A partir de este método se pretende construir un sistema comercial automatizado que sustituya la transiluminación (Choudhury *et al.*, 2002).

1.6.2.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Algunos autores proponen la PCR para la amplificación secuencias específicas del ADN de los Anisákidos y es considerado un método rápido y específico para la detección e identificación taxonómica de los parásitos del pescado (Matsuura *et al.*, 1992; D'Amelio *et al.*, 2000; Martín-Sánchez *et al.*, 2005). Las técnicas de PCR también son utilizadas en la identificación y detección de alérgenos de *Anisakis*, sin embargo, la aplicación de esta tecnología aún no se encuentra muy extendida en este campo (López, 2009).

Los métodos de ADN consisten en la amplificación específica de un fragmento de ADN de la muestra alergénica mediante un par de cebadores que flanquean el fragmento de interés (Van Hengel, 2007). La reacción de amplificación consiste básicamente en tres pasos, una desnaturalización, la unión de los cebadores y una extensión por cada ciclo de amplificación. En la PCR convencional los productos de amplificación generalmente son visualizados mediante electroforesis con tinción fluorescente, siendo una técnica cualitativa, mientras que la utilización de la PCR a tiempo real (qPCR) y la PCR-ELISA permiten una cuantificación de la cantidad de la molécula diana (Poms *et al.*, 2004).

1.7 Tratamiento tecnológicos aplicados para la inactivación de las larvas de *Anisakis* en pescado

El informe de la EFSA (2010) considera que la aplicación de tratamientos de congelación y de calentamiento de *A. simplex* durante un determinado tiempo y temperatura, son suficientes para producir la muerte de las larvas y evitar la infestación de los consumidores. Sin embargo, no hay evidencia de las posibles modificaciones que puedan darse a estas condiciones en función de las distintas especies de larvas, temperatura del hábitat, o tiempo pasado desde la muerte del pez. A continuación se citan los tratamientos tecnológicos aplicados al pescado infestado y corresponden a estudios aislados en condiciones específicas (EFSA, 2010).

1.7.1 Congelación

Este método ofrece buenos resultados, sin embargo la congelación rápida es eficaz para inactivar las larvas pero no destruye la capacidad de producir alergia de todos sus antígenos, generando que los pacientes sensibilizados desarrollen síntomas tras la ingesta de pescado congelado (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010). Asimismo, se ha comprobado por microscopía electrónica de barrido ambiental (ESEM) que la cutícula de la larva puede alterarse modificando su permeabilidad (Tejada *et al.*, 2006a). Esto puede generar la liberación de alérgenos al medio cuando

las larvas congeladas se someten a tratamientos culinarios posteriores (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; Solas *et al.*, 2009; Vidaček *et al.*, 2009b).

En lo concerniente a legislación existe cierta discrepancia. A diferencia de las condiciones recomendadas en Europa (Reglamentos 853/2004, 854/2004, 1276/2011; Real Decreto 1420/2006), las establecidas por la Food and Drug Administration de EEUU (FDA, 2011) no tienen en cuenta la temperatura alcanzada en el centro térmico por lo que pueden ser excesivas en función a las características fisicoquímicas del pescado o piezas a congelar, pudiendo representar un perjuicio económico para la industria pesquera.

1.7.2 Calentamiento

Diversos estudios nos demuestran que 60°C durante 1 minuto en el centro térmico es suficiente para matar cualquier larva presente en un producto de la pesca (Bier, 1976), siendo estas condiciones las recomendadas por la EFSA (2010) y la UE (Reglamento 1276/2011). Sin embargo en estudios realizados en larvas aisladas se ha observado que el tiempo necesario para producir la muerte de las larvas al 100% es superior a 1 minuto y depende del lote de larvas estudiado (Vidaček *et al.*, 2010). No obstante, alcanzar esa temperatura en tratamientos térmicos convencionales, dependerá del espesor y composición del producto. Al aplicar el tratamiento térmico en un producto de la pesca, es necesario tener en cuenta las condiciones de tiempo y temperatura necesarias para matar las larvas en todas las zonas donde estén alojadas, en especial en piezas de gran tamaño.

En cuanto al calentamiento por microondas hay estudios que muestran la viabilidad de las larvas a diferentes temperaturas, encontrándose que por este procedimiento se requiere una alta temperatura para matar a las larvas debido al calentamiento desigual (Adams y Devlieger, 2000). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la eficacia de las microondas depende del poder de penetración ($\approx 1,5$ cm en hornos de microondas domésticos) y si la transmisión de calor desde la superficie hasta el centro térmico se distribuye uniformemente y penetra la pieza. Estudios más recientes han comprobado

que el calentamiento por microondas es más eficaz para producir la muerte de las larvas cuando penetran toda la pieza y su distribución es homogénea, observándose por microscopía electrónica de barrido (SEM) cambios en las larvas y menos modificaciones indeseadas en las características sensoriales del pescado (Vidaček *et al.*, 2009b; 2011).

Debemos tener en cuenta que aunque se produzca la muerte de las larvas, se ha detectado la presencia de antígenos termo-resistentes en las condiciones de calentamiento más extremas estudiadas, inclusive si las larvas se encontraban congeladas antes de aplicar el tratamiento de calor, lo que sugiere que productos sometidos a tratamientos térmicos podrían ser no seguros para pacientes previamente sensibilizados a alérgenos de *A. simplex* (Vidaček *et al.*, 2009b; 2010; 2011; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010).

1.7.3 Adición de salmuera

Las larvas de *Anisakis* son sensibles a tratamiento en salmuera bajo ciertas condiciones. En arenques, se ha estimado que 28 días de almacenamiento con salmuera al 6,3% y 3,7% de ácido acético son suficientes para matar las larvas presentes (Karl *et al.*, 1995). Por otro lado, se ha demostrado que bajo condiciones industriales de producción de arenques salados, el tiempo necesario para matar a la larvas es de 20 días (EFSA, 2010).

De acuerdo a un estudio realizado por la AESAN (2007), se estima que cuando la concentración de NaCl en el pescado infestado supera el 8-9% durante al menos 6 semanas, no es necesaria la congelación del producto para matar las larvas.

1.7.4 Marinado

Se considera que estos tratamientos dados en condiciones domésticas o industriales no son suficientes para producir la muerte de las larvas, por lo que en Europa es obligatorio para los establecimientos que comercializan pescado crudo o

con tratamientos que no matan las larvas, congelar el pescado que se va a someter a estos tratamientos. El tiempo y las condiciones de marinado para producir la muerte de las larvas depende de la especie de pescado y de la concentración de sal en el medio, pudiendo variar entre 35-119 días (Karl *et al.*, 1995).

Para producir la muerte de las larvas a condiciones de pH ácido se ha propuesto el tratamiento de pescado parasitado con una alta concentración de ácido acético (10%) y sal (12%) seguido de un lavado para disminuir la concentración a niveles sensoriales aceptables por el consumidor (Sánchez-Monsálvez *et al.*, 2005).

Por otro lado, en boquerones en vinagre hechos a partir de filetes frescos y congelados, se han detectado Anisakis 4 y otros alérgenos de *A. simplex* durante todo el periodo de conservación en refrigeración en la fase líquida y en el músculo fresco y congelado, por lo que aunque el tratamiento se efectúe en pescado previamente congelado no se descarta la posibilidad que consumidores sensibilizados puedan sufrir reacciones alérgicas (Solas *et al.*, 2009).

1.7.5 Ahumado

Se ha establecido que las condiciones de ahumado en caliente, 70-80°C durante un tiempo de 3 a 8 horas, son suficientes para producir la muerte de las larvas de *Anisakis* (FDA/CFSAN, 2001; Sainclivier, 1985). Por otro lado, el ahumado en frío, en el que la temperatura del producto se mantiene por debajo de 60°C, no es suficiente para producir la muerte de las larvas por lo que es necesario someter el producto a congelación (EFSA, 2010).

1.7.6 Altas presiones

El objetivo principal del tratamiento por altas presiones en pescado infestado, es producir la muerte de las larvas sin causar cambios en el músculo de pescado que alteren la apariencia y características del pescado crudo. En general la presurización favorece la muerte de la larva, sin embargo puede producir desnaturalización de las

proteínas del pescado generando modificaciones intra e inter proteínas (Oshima *et al.*, 1993).

La condiciones necesarias para producir la muerte de las larvas difieren según lo estudios realizados, pero en todos los casos la presión aplicada es ≥ 200 MPa a tiempos ≥ 1 min (Molina-García y Sanz, 2002; Dong *et al.*, 2003; Brutti *et al.*, 2010; Vidaček *et al.*, 2009c). El efecto de estos tratamientos en larvas vivas y muertas por congelación (-20°C , ≥ 24 h) ha sido observado por SEM y se manifiesta como roturas de la cutícula, siendo más evidentes al incrementarse las condiciones de tiempo y presión del tratamiento. También se han detectado modificaciones indeseadas en el músculo de pescado en función de la intensidad del tratamiento (Vidaček *et al.*, 2009c).

La detección de alérgenos de *Anisakis* por inmunodetección e inmunohistoquímica, incluso en condiciones extremas de tratamiento, nos indica que a pesar de que se evite la infestación al estar las larvas muertas, se pueden producir episodios alérgicos en individuos previamente sensibilizados (Vidaček *et al.*, 2009c).

1.7.7 Electrocutión

Se trata de un método patentado (Bereciartua, 2005) que consiste en someter a los pescados recién capturados a una corriente eléctrica por inmersión en recipientes con una disolución de electrolitos donde el ánodo y el cátodo proporcionan una intensidad que puede variar en función de tamaño y características del pescado y parásito a eliminar. Se aplica de forma individualizada en especies de gran tamaño o en forma masiva en especies pequeñas. Los autores de la patente consideran que se inactivan las larvas sin que se produzcan cambios sensoriales en el pescado.

1.7.8 Irradiación

De acuerdo a la EFSA (2010) los tratamientos de irradiación no son considerados como adecuados debido a que las dosis eficaces para producir la muerte

de las larvas (FAO/IAEA, 1992; Seo *et al.*, 2006) son muy superiores a las recomendadas para aplicar a pescado y mariscos (3 kGy).

1.7.9 Adición de extractos vegetales y otros productos

Diversos estudios experimentales han determinado que productos vegetales como el jengibre (*Zingiber officinale*) contienen principios activos, como el shogaol y gingerol, que destruyen las larvas de *Anisakis* bajo condiciones específicas (Goto *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 2010; Hierro *et al.*, 2004; 2006).

De forma similar, otros estudios *in vivo* e *in vitro*, han evaluado la actividad larvicida en *A. simplex*. de ciertos derivados monoterpénicos obtenidos de aceites esenciales, como ocimeno, α -pineno, β -pineno, geranil acetato, cineol, mirceno, nerolidol, citronellol, citral, carvacrol, elemol, farnesol, entre otros. Los estudios *in vivo* se realizan en ratas administrando estos compuestos juntamente con las larvas, mientras que los estudios *in vitro* tratan de adicionarlos a alimentos infestados para disminuir la patogenicidad de la larva (Hierro *et al.*, 2004; Navarro *et al.*, 2008; 2010).

1.8 Antígenos y alérgenos de *Anisakis*

Un antígeno es una sustancia que desencadena la formación de anticuerpos y puede causar una respuesta inmune mientras que un alérgeno es un antígeno que produce una reacción clínica, que se traduce en una respuesta de hipersensibilidad (Brasó y Jorro, 2003). Los alérgenos se asocian con anticuerpos sensibilizantes, que con mayor frecuencia son de la clase IgE y que se encuentran previamente fijados en la superficie de mastocitos o basófilos, liberándose tras la unión antígeno-anticuerpo sustancias mediadores de la inflamación, apareciendo así los síntomas alérgicos (Taylor, 2006).

A. simplex es capaz de producir una respuesta inmunológica durante la infestación en el ser humano. Los antígenos responsables se dividen en 3 categorías: de secreción-excreción, somáticos y de superficie (Valls *et al.*, 2009).

1.8.1 Antígenos somáticos

Los antígenos somáticos son las proteínas más abundantes en los nematodos, su peso molecular varía entre 13 y 150 kDa (Iglesias *et al.*, 1993; Valls *et al.*, 2009) e incluyen proteínas implicadas en el metabolismo que pueden conducir a reactividades cruzadas con otros nematodos, como el caso de la tropomiosina, por lo que pueden ser responsables de falsos positivos en el diagnóstico (Lorenzo *et al.*, 1999; Lozano Maldonado *et al.*, 2004). En este grupo se incluyen proteínas de las vías neoglucogénesis y de la síntesis de ácidos grasos (Valls *et al.*, 2005; 2009). Estos antígenos se obtienen por homogenización de las larvas enteras y contienen todas las proteínas solubles del parásito.

1.8.2 Antígenos de excreción-secreción (ES)

Son sintetizados en la glándula esofágica dorsal y en las células secretoras del tracto digestivo del nematodo, y son liberadas al medio durante la infección, siendo los anticuerpos de estos antígenos los primeros en aparecer (Iglesias *et al.*, 1993; Valls *et al.*, 2009). Se ha descrito que los extractos de excreción-secreción poseen determinadas actividades enzimáticas (actividad proteolítica e hialuronidasa) (Perteguer *et al.*, 1996) y se piensa que estas proteínas ayudan al parásito a penetrar en la mucosa gástrica y pueden desgranular los mastocitos en ratones sensibilizados (Kobayashi *et al.*, 1972).

Los anticuerpos frente a estos antígenos fueron los primeros en detectarse (Iglesias *et al.*, 1993). Los antígenos de superficie y excreción-secreción presentan distinto patrón de bandas en inmunodetección de IgE específica según se hayan extraído de larvas en estadio L3 o L4, sugiriendo que estas proteínas son expresadas de manera diferente en ambas fases larvarias (Iglesias *et al.*, 1995).

1.8.3 Antígenos de superficie

La cutícula de los nematodos está compuesta principalmente por colágeno, pero en su superficie muestran cierto número de proteínas hidrofóbicas con alto potencial antigénico. La parte más externa está recubierta de una capa rica en polisacáridos. Estos antígenos se expresan cuando ha tenido lugar la ecdisis, es decir, la transición interlarvaria (de L3 a L4) y se ha sugerido que este tipo de antígenos son menos específicos de los somáticos y los ES (Valls *et al.*, 2005). En cualquier caso, se ha considerado que estos antígenos podrían tener cierta importancia en las respuestas inmunes a largo plazo al ser un estímulo crónico, por ejemplo, en los granulomas eosinofílicos que rodean los restos cuticulares del nematodo al morir la larva tras penetrar en la pared del tracto digestivo (Baeza *et al.*, 2001; Valls *et al.*, 2009).

1.8.4 Alérgenos de *A. simplex*

La alergia a *Anisakis* se manifiesta como una respuesta de hipersensibilidad medida por inmunoglobulina E (IgE) a distintas proteínas alergénicas del parásito que se asocian a los productos de secreción-excreción o a proteínas somáticas de las larvas de Anisákidos (Moneo *et al.*, 2000b).

Con el fin de poder realizar un diagnóstico específico tanto de la anisakiosis como de la alergia a *Anisakis*, desde el año 2000 se vienen realizando estudios sobre el aislamiento molecular y caracterización de los alérgenos de la L3 de *A. simplex*.

Aunque en la actualidad sólo se han identificado 12 alérgenos, Arlian *et al.* (2003) han reportado la existencia de al menos 18 diferentes alérgenos de *A. simplex*, sugiriendo la existencia de un número indefinido de alérgenos aún no identificados.

Los principales alérgenos de *Anisakis* descritos por la International Union of Immunological Societies (WHO/IUIS) Allergen Nomenclature Sub-Committee se encuentran resumidos en la Tabla 1.4 y sus características principales se describen a continuación.

Tabla 1.4 Principales características de las proteínas alergénicas de *Anisakis*

Alérgeno	Tipo antígeno	PM	PI	Nombre bioquímico	Principales características
Ani s 1	ES	24	7,60	Inhibidor serin proteasa	Reconocida por 85% de pacientes alérgicos. Presenta 18 residuos Cys. Termo-resistente
Ani s 2	Somático	97	5,21	Paramiosina	Reconocida por 88% de pacientes alérgicos.
Ani s 3	Somático	41	4,62	Tropomiosina	No es un alérgeno importante en la sensibilización al parásito. Termo-resistente.
Ani s 4	ES	9	5,57	Inhibidor cistein proteasa (cistatina)	Reconocida por 27% de pacientes alérgicos, alto valor diagnóstico. Presenta 2 residuos Cys. Termo-resistente y resistente a pepsina
Ani s 5	ES	15	4,94	Familia SXP/RAL-2	Reconocida por 25% de pacientes alérgicos, alto valor diagnóstico. Termo-resistente.
Ani s 6	ES	9,7	9,68	Inhibidor serin proteasa	Reconocida por 18% pacientes alérgicos. Termo-resistente y resistente a pepsina
Ani s 7	ES	139	8,46		Reconocida por 100% de pacientes alérgicos. Sin homología con otra proteína o alérgeno descrito.
Ani s 8	ES	15	4,51	Familia SXP/RAL-2.	Reconocida por 25% de pacientes alérgicos. Similar a Ani s 5. Termo-resistente.
Ani s 9	ES	14	9,06	Familia SXP/RAL-2.	Reconocida por 13% de pacientes alérgicos. Termo-resistente.
Ani s 10	Somático	21	4,20	Función desconocida	Reconocida por 39% de pacientes alérgicos. Termo-resistente
Ani s 11		27		Función desconocida.	Reconocida por aprox. 50% de pacientes alérgicos.
Ani s 12		31		Función desconocida.	Reconocida por aprox. 57% de pacientes alérgicos.

PM: Peso molecular en kDa; **PI:** Punto isoelectrico

Fuente: IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee (Agosto 2012).

- Ani s 1

Es un alérgeno principal (King *et al.*, 1994; Aalberse, 2000) ya que es reconocido por un 85% de sueros de pacientes con IgE específica. Tiene un peso molecular aparente de 24 kDa y punto isoeléctrico de 7,6 (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2006). Se encuentra principalmente en la glándula de secreción del parásito. Recientemente ha sido clonado y secuenciado, encontrando en la secuencia de aminoácidos la presencia de 18 residuos de cisteína (Cys) que podrían formar hasta 9 enlaces disulfuro (Shimakura *et al.*, 2004, Rodríguez-Mahillo, 2006). Aunque se ha encontrado una homología del 30-40% con el dominio inhibidor de tripsina tipo Kunitz de proteínas de *Caenorhabditis elegans* no se ha podido demostrar que posea dicha actividad.

Se ha descrito en la literatura otro alérgeno distinto, de 21 kDa, nombrado como Ani s 1 con un 91% de identidad con la troponina C de *Onchocerca volvulus* y *Caenorhabditis elegans* que es reconocido por el 20% de los pacientes sensibilizados a *A. simplex* (Arrieta *et al.*, 2000).

- Ani s 2

Es una proteína de unos 97 kDa, con más del 85% de identidad con las paramiosinas de *Caenorhabditis elegans* y *Onchocerca volvulus* y más de un 30% de identidad con las paramiosinas de artrópodos (*Drosophila melanogaster*) o trematodos (*Schistosoma japonicum*). Esta proteína es reconocida por un 88% de los pacientes con IgE específica frente a *A. simplex* (Pérez-Pérez *et al.*, 2000).

- Ani s 3

Es una proteína de unos 41 kDa con una alta homología con las tropomiosinas de otros nematodos como *Trichostrongylus columbriformis* (93% de identidad) o *Caenorhabditis elegans* (92%), filarias como *Onchocerca volvulus* (91%), crustáceos (70%), insectos (69%) y moluscos (63-56%). Hay estudios que indican que la tropomiosina de *A. simplex* no es un alérgeno importante en la sensibilización al parásito, por poseer reactividades cruzadas con tropomiosinas de otras especies (Asturias *et al.*, 2000a, 2000b).

- **Ani s 4**

Es una proteína termo-resistente de unos 9 kDa y punto isoeléctrico de 5,57. Se ha demostrado que su alergenicidad se mantiene después de someterla a condiciones de calor o pepsina superiores a las que se utilizan generalmente al cocinar el pescado o durante la digestión, ya que mantiene su capacidad alergénica después de someter a ebullición durante 30 minutos un extracto de proteínas de *A. simplex* y ser tratadas con pepsina ácida en condiciones más extremas que en la digestión gástrica (Moneo *et al.*, 2000a; Caballero y Moneo, 2004; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008). A partir de su secuencia aminoterminal se ha logrado caracterizar su función como inhibidor de cistein-proteasas (cistatina); además, posee dos residuos de Cys que facilitan la formación de un enlace disulfuro (Rodríguez-Mahillo, 2006).

Desde el punto de vista tecnológico se ha considerado al alérgeno Ani s 4 como idóneo para estudiar conjuntamente la acción de los tratamientos dados al pescado en el reconocimiento de alérgenos al ser una proteína de bajo peso molecular (9 kDa), estable al ácido, pepsina y alta temperatura y ser un alérgeno que se ha relacionado con episodios de anafilaxia y aunque se trata de un alérgeno minoritario de *A. simplex* ya que se estima que es reconocido por el 27% de los pacientes alérgicos a *Anisakis*, posee un alto valor diagnóstico.

- **Ani s 5**

Es una proteína termo-resistente de 15 kDa. Se encuentra principalmente en la glándula de secreción, ventrículo y superficie del epitelio intestinal. Su secuencia amino terminal de 152 aminoácidos, es homóloga a la de proteínas de SXP/RAL-2 de *Meloidogyne incognita* y la proteína AS16 de *Ascaris suum* (Kobayashi *et al.*, 2007). Se trata de un alérgeno secundario de *A. simplex* de función desconocida, aunque es reconocido por el 25% de los pacientes y de alto valor diagnóstico (Caballero *et al.*, 2008).

- **Ani s 6**

Proteína de unos 9,7 kDa. Alérgeno secundario de *A. simplex*, reconocido por el 18% de los pacientes y de valor diagnóstico no comprobado. Posee una secuencia amino terminal de 84 aminoácidos, similar a la de inhibidores serin-proteasa y en su estructura contiene 10 residuos de Cys que facilitan formación de 5 enlaces disulfuro (Kobayashi *et al.*, 2007).

- **Ani s 7**

Proteína con peso molecular aparente de 139 kDa. Se le ha identificado como uno de los alérgenos de mayor importancia de *A. simplex* y de gran valor diagnóstico ya que es identificado por el 100% de pacientes alérgicos (Anadón *et al.*, 2009). Por el momento su función es desconocida y no guarda homología con otra proteína o alérgeno descrito (Rodríguez *et al.*, 2008).

- **Ani s 8**

Es una proteína termo-resistente de unos 15 kDa. Alérgeno secundario de *A. simplex* y reconocido por el 25% de los pacientes. Se le ha identificado como miembro de la familia de proteínas de SXP/RAL-2, al igual que Ani s 5 y guarda similitud con AS16 y AS14 de *Ascaris suum*. Aunque su función aún es desconocida posee 10 isoformas descritas (Kobayashi *et al.*, 2007).

- **Ani s 9**

Proteína termo-resistente de 14 kDa y punto isoeléctrico de 9,06. Se le ha identificado como alérgeno secundario de *A. simplex*, con alto valor diagnóstico y reconocido por el 13% de los pacientes. Al igual que Ani s 5 y Ani s 8, posee un 60% similitud con AS14, formando parte de la familia de proteínas de SXP/RAL-2. Sus funciones aún son desconocidas (Rodríguez-Pérez *et al.*, 2008).

- **Ani s 10**

Este alérgeno fue detectado por quimioluminiscencia de una biblioteca de expresión de cADN construido a partir de larvas L3 de *A. simplex*. No presenta homología con ninguna otra proteína descrita, y su secuencia se compone de siete

repeticiones casi idénticas de 29 aminoácidos cada una. Es reconocida por un total de 39% de los pacientes alérgicos a *Anisakis* (Caballero *et al.*, 2011).

- **Ani s 11**

Alérgeno identificado por quimioluminiscencia a partir de una biblioteca de expresión de cADN construido a partir de larvas L3 de *A. simplex*. Proteína de 307 aminoácidos, peso molecular de 27 kDa y de función aún desconocida. Posee un 45% de similitud con Ani s 10 y su secuencia se compone de cinco a seis repeticiones cortas de 5 a 16 aminoácidos cada una. Reconocida por casi el 50% de los pacientes alérgicos a *Anisakis* (Kobayashi *et al.*, 2011).

- **Ani s 12**

Se trata de una proteína de 295 aminoácidos y peso molecular de 31 kDa. Posee una estructura única que se compone de cinco repeticiones en tándem, similar a la secuencia de Ani s 7. Reconocida por el 57% de los pacientes alérgicos. Sus funciones aún son desconocidas (Kobayashi *et al.*, 2011).

1.9 Técnicas de detección de alérgenos de *Anisakis*

En los últimos años, la detección de alérgenos en los alimentos ha recibido mayor atención por parte de la industria y los organismos legislativos. Esta preocupación se ha visto traducida en la mejora de las medidas destinadas a la protección de los consumidores alérgicos (Van Hengel, 2007).

La producción controlada de productos alimenticios y las actividades de control ejecutadas por los organismos de inspección de alimentos se basan en la disponibilidad de métodos capaces de detectar trazas de ingredientes alergénicos. En la actualidad, el desarrollo de estos métodos se enfrenta a una multitud de retos analíticos y son diversos los enfoques técnicos que han sido diseñados para detectar la presencia de proteínas alergénicas en los productos alimenticios (Poms *et al.*, 2004). Muchos de los métodos no se dirigen a una proteína específica, si no mas bien a un

marcador de la presencia del alimento responsable de la alergia. Los métodos basados en proteínas por lo general implican técnicas inmunológicas (basadas en anticuerpos); mientras que los métodos basados en el ADN amplifican los fragmentos específicos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el que la especificidad se logra mediante el uso de cebadores que facilitan la amplificación de ADN procedente del alimento (Van Hengel, 2007).

Se ha establecido que uno de los factores limitantes en la detección de alérgenos en alimentos en general, es la matriz alimentaria. Sin embargo, el procesamiento del alimento, las propiedades bioquímicas e inmunológicas del alérgeno y la sensibilidad del paciente son factores que también deben tenerse en cuenta (Sathe y Sharma, 2009).

Sathe *et al.* (2005) ha establecido que el tratamiento térmico en pescados enlatados puede disminuir la alergenicidad del producto. Sin embargo, también puede darse la situación contraria, es decir, que durante el procesamiento térmico, los epítomos normalmente ocultos pueden mostrarse y causar nuevas alergias (Van Hengel, 2007). A continuación se describe de forma general los métodos utilizados en el presente trabajo de investigación.

1.9.1 Inmunodetección

1.9.1.1 Western-blot

La inmunodetección por Western-blot es una técnica mediante la cual se separan proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida y después se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o similar, donde son detectadas con anticuerpos que reconocen los antígenos que hay en ellas. La inmunodetección se puede realizar mediante IgE, anticuerpos monoclonales o policlonales. La ventaja de los anticuerpos policlonales es que poseen la capacidad de reconocer varios epítomos, aumentando el umbral de detección (Poms *et al.*, 2004).

Consta de tres fases, en la primera fase se separan las proteínas extraídas mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida, de esta manera los antígenos proteicos que se quieren utilizar para detectar los anticuerpos son separados electroforéticamente en un gel según su peso molecular. En una segunda fase, denominada inmunoblotting o inmunotransferencia, se transfieren las proteínas que han quedado separadas en el gel de poliácridamida a una membrana de nitrocelulosa mediante una nueva técnica de electroforesis. En la tercera y última fase se utiliza la membrana de nitrocelulosa para identificar los anticuerpos dirigidos contra las proteínas transferidas (Kurien y Scofield, 2009).

La inmunodetección con IgE específica ha sido propuesta como un método muy útil para la determinación de IgE específica frente a *Anisakis* (Del Pozo *et al.*, 1996; García *et al.*, 1997) sin embargo, aún no se ha incorporado en la rutina de los laboratorios de alergia. Esto puede deberse a que, aunque este tipo de ensayo tiene una ventaja evidente, que es la información que aporta sobre el tipo de antígenos que reconoce cada paciente, también tiene dos limitaciones importantes, que son la disponibilidad de L3 de *A. simplex* necesarias para obtener cantidades suficientes de antígeno de excreción-secreción y los tiempos de desarrollo de la técnica (Rodríguez-Mahillo, 2006; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2011).

1.9.1.2 Dot-blot

Dot-blot es una técnica de biología molecular que permite detectar biomoléculas. Representa una simplificación de los métodos Northern-blot, Southern-blot, ó Western-blot. En esta técnica las proteínas son aplicadas directamente sobre una membrana y posteriormente se realiza la detección por sondas de nucleótidos (Northern-blot y Southern-blot) ó anticuerpos (para un Western-blot) (Poms *et al.*, 2004).

La característica principal de Dot-blot es el uso de inmunodetección para identificar a una proteína específica. Una vez que las proteínas se inmovilizan en una membrana de nitrocelulosa o PVDF (fluoruro de polivinilo), se puede probar con un anticuerpo

primario específico para la proteína de interés. El anticuerpo se visualiza, con una etiqueta específica unida al anticuerpo primario o con un anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario es un anticuerpo general que reconoce el dominio constante de Inmunoglobulina G (Poms *et al.*, 2004).

Las etiquetas más comunes usadas en Dot-blot son enzimas que catalizan un sustrato para producir ya sea luz, que se detecta con la radiografía, o el color que se visualiza en la membrana. Las enzimas de elección son la peroxidasa (HRP) y fosfatasa alcalina (AP). Un paso adicional que es crucial para el Dot-blot se conoce como el paso de bloqueo. Este paso se utiliza para aumentar la especificidad de la técnica de Dot-blot y evitar interacciones no específicas. Si las membranas no están bloqueadas, los anticuerpos pueden adherirse a proteínas no específicas debido a su carga. Para evitar esto, la membrana es colocada en una mezcla de proteínas y las proteínas bloquean las cargas que pueden atraer los anticuerpos. Se utilizan diversos agentes bloqueadores, incluyendo leche en polvo, albúmina de suero bovino y caseína, sin embargo, los agentes bloqueadores modernos utilizan proteínas sintéticas a fin de prevenir cualquier reacción cruzada con los anticuerpos de los animales (Kurien y Scofield, 2009).

La técnica ofrece importante ahorro de tiempo y una alta sensibilidad en la detección, sin embargo, no ofrece información sobre el tamaño de la biomolécula blanco (Besler, 2001). Además, si dos moléculas de diferentes tamaños son detectadas, se seguirá viendo como un solo punto. Por lo tanto el Dot-blot sólo puede confirmar la presencia o ausencia de una biomolécula o biomoléculas que pueden ser detectados por las sondas de ADN o el anticuerpo (Kurien y Scofield, 2009).

En la Patente N° 2 340 978 *Método de extracción y detección de antígenos de Anisakis en alimentos destinados al consumo humano y animal* (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2011), se ha desarrollado un método que permite detectar y cuantificar por Western blot y Dot blot alérgenos de *A. simplex* en músculo de pescado y productos procesados (Tejada *et al.*, 2008; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010; Vidaček *et al.*, 2009a; 2010; 2011). El método descrito en la patente es sensible y

específico, puede llegar a detectar Ani s 4 en cantidades inferiores a 1 ppm con tasas de recuperación mayores a un 65%, y no se ha observado reactividad cruzada con otros componentes (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2011).

1.9.2 Inmunohistoquímica

Se trata de un procedimiento que se encuentra dentro del grupo de técnicas de inmunodetección, que por medio de una reacción antígeno-anticuerpo puede ser visualizada mediante microscopia óptica o electrónica. Esta reacción, que permite la identificación de un constituyente del tejido *in situ*, es visible sólo si el anticuerpo está marcado con una sustancia que absorbe o emite luz o un coloide de un metal pesado, como por ejemplo el oro (Hodges *et al.*, 1984; Duerr, 2006). A nivel de microscopia electrónica, el oro coloidal debido a su alta densidad, es el marcador que consigue una mejor resolución para la localización de los antígenos y es prácticamente imposible confundirlo con cualquier estructura biológica (Roth, 1983; Rojas *et al.*, 1994; Oliver, 2010).

La inmunohistoquímica con marcaje de oro coloidal se realiza en secciones ultra finas de tejido fijado y montadas en rejillas de oro o níquel para su observación por microscopia electrónica. Las partículas de oro pueden ser conjugadas con anticuerpos primarios para la identificación de un sólo paso de antígenos (marcaje directo) pero generalmente se utilizan métodos de detección indirectos, donde además del anticuerpo primario se incluyen otros anticuerpos (anticuerpos secundarios) o ligandos (proteína A), siendo éstos los portadores de la partícula de oro coloidal (Molday y Maher 1980). Los conjugados del anticuerpo son absorbidos en gammaglobulinas, de determinadas especies animales, mezclada con un dializado de etilenglicol (Duerr, 2006).

El tamaño de la partícula de oro oscila entre 1 a 100 nm, sin embargo los tamaños comúnmente empleados para estudios de IHC son de 10-15 nm. Por otro lado, este tipo de técnica necesita de controles internos o paralelos, usualmente positivos y

negativos. El control negativo se obtiene realizando la misma técnica, pero con omisión del paso de incubación con anticuerpo primario (Oliver, 2010).

La técnica de inmunohistoquímica ha permitido la detección de *Anisakis* en larvas y músculo de pescado sometidos a diversos tratamientos (Solas *et al.*, 2009; Vidacek *et al.*, 2009c; 2010; 2011). Al tratarse de un método de detección *in situ*, permite la detección del alérgenos inclusive cuando la estructura del músculo se encuentra modificada, tal como ocurre durante el calentamiento o congelación prolongada (Vidaček *et al.*, 2011).

La mayoría de los métodos tradicionales de inmunodetección utilizados para detectar alérgenos en alimentos, depende de la extracción de las proteínas alergénicas de la matriz alimentaria, por lo tanto, si la estructura del músculo se encuentra modificada, las proteínas solubles pueden quedar atrapadas en el músculo, convirtiéndose así no extraíbles en condiciones estándar (Tejada *et al.*, 2003a).

1.10 Estudios realizados en *Anisakis*

En la actualidad, existen multitud de trabajos parciales centrados en la problemática generada por la infestación de los peces y humanos por *Anisakis*. Los principales enfoques de dichos estudios están referidos a la infestación de peces, prevalencia e intensidad de las infestaciones en distintas especies de pescado y áreas y caladeros de pesca (Novothy y Uzmann, 1960; Smith y Wooten, 1975; 1984; Smith 1983; 1984; Navone *et al.*, 1998; Osanz Mur, 2001; Abbattouy, 2012); identificación de las especies de *Anisakis* que infestan los peces (Mattiucci *et al.*, 1986; 1997; 1998; 2001; 2002; 2007; 2008; 2009; 2010; Valero *et al.*, 2006; Abattouy *et al.*, 2011; Abattouy, 2012); identificación de casos clínicos de Anisakiasis en humanos (infestaciones y alergias) (Audicana *et al.*, 2002; Moneo *et al.*, 2007; Audicana y Kennedy, 2008; González-Muñoz *et al.*, 2009); estudios inmunológicos para detectar e identificar los distintos alérgenos en *A. simplex* y de estabilidad y resistencia de los alérgenos a determinados tratamientos

(Audicana *et al.*, 2002; Caballero y Moneo, 2004; Moneo *et al.*, 2007; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007; Audicana y Kennedy, 2008; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010); estudios tecnológicos destinados a detectar la presencia de larvas vivas o muertas en pescado (Karl *et al.*, 1995; Choudhury *et al.*, 2002; Nilsen *et al.*, 2004; Stormo *et al.*, 2004; Bereciartua, 2005; Heia *et al.*, 2007); o tratamientos tecnológicos para producir la muerte del parásito (efecto de alta o baja temperatura, altas presiones, pH, salinidad, irradiación, microondas, altas presiones en la mortalidad de los parásitos) (Molina-García y Sanz, 2002; Padovani, 2003, Dong *et al.*, 2003; Sánchez-Monsalvez *et al.*, 2005; Uresti *et al.*, 2006; Tejada *et al.*, 2006b; Brutti *et al.*, 2010).

Sin embargo, el estudio de la acción individual o simultánea de estos tratamientos en la resistencia de las larvas y en la estabilidad de los alérgenos segregados/excretados o liberados al medio por las larvas de *Anisakis*, así como su efecto en el músculo de pescado, han sido principalmente abordados en el proyecto ANITRAT (PN I+D+i AGL2005-05699-C02-01/02, Eficacia de distintos tratamientos tecnológicos y culinarios en la mortalidad de las larvas de Anisákidos. Efecto del tratamiento sobre el reconocimiento de los alérgenos) y actualmente en el proyecto ANIDET (AGL2009-12485-C03-01/02/03, Detección e identificación de *Anisakis* sp. y sus alérgenos en pescados y productos de la pesca destinados al consumo humano y animal. Aplicación de tratamientos selectivos y efecto sobre los alérgenos de *Anisakis* de distintas especies y origen. Enero 2012-Diciembre 2012).

1.10.1 Principales estudios tecnológicos realizados en el proyecto ANITRAT

Los principales estudios tecnológicos realizados han tenido como objetivo determinar las condiciones de muerte de las larvas, las modificaciones en el reconocimiento de alérgenos con los tratamientos aplicados al pescado, como afectan a la excreción-secreción o liberación del alérgeno al medio y como afectan al alérgeno. El efecto de los distintos tratamientos tecnológicos sobre las larvas y sobre la liberación, extracción y reconocimiento de los alérgenos se ha estudiado conjuntamente desde el punto de vista tecnológico e inmunológico y se ha aplicado a

larvas vivas y muertas por congelación y en músculo infestado refrigerado y congelado.

Tratamiento en larvas

El efecto sobre viabilidad de las larvas y sobre su integridad al aplicar distintos tratamientos (congelación, calor, altas presiones, acidez) a larvas vivas y muertas por congelación, ha sido estudiado determinando fundamentalmente la viabilidad, la emisión de fluorescencia (366 nm), tinción con distintos colorantes, cambios en la cutícula, forma e integridad de la larvas por microscopía electrónica de barrido (SEM) y SEM ambiental (ESEM) (Tejada *et al.*, 2006a; 2006b; 2007; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010; Solas *et al.*, 2008; 2009; Vidaček *et al.*, 2009a; 2009b; 2010; 2011).

Paralelamente, se ha estudiado el efecto de la pepsina en muestras sin tratar y después de aplicar los distintos tratamientos en condiciones de simulación de una digestión gástrica humana (3,3 mg pepsina, 30 mM NaCl, 0,06 M HCl, pH 1,8) con el fin de evaluar si la ingestión de pescado crudo o cocinado refrigerado y congelado puede producir alergia en el consumidor y en las empleadas para la inspección de parásitos en el pescado (10 mg mL⁻¹ pepsina 0,3 M HCl, pH 1-1,15) (CODEX, 2004; Solas *et al.*, 2009; Vidaček *et al.*, 2010; 2011).

Tratamiento en larvas y músculo

Los principales tratamientos utilizados han sido congelación, calor (convencional y microondas) y acidez, aplicados a larvas aisladas o a pescado infestado con larvas vivas o muertas por congelación, con distintas condiciones de tiempo-temperatura y tiempo de conservación.

En los estudios realizados en larvas y pescado infestado congelado se ha comprobado que se produce la muerte de las larvas en congelación a las condiciones recomendadas (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010), sin embargo se ha observado cambios en la permeabilidad en la cutícula incluso en periodos cortos de congelación (-20°C, 72 h) que se manifiesta como una deshidratación de las larvas cuando se

observan en condiciones de vacío (Tejada *et al.*, 2006b; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008).

En general se ha comprobado que la muerte de las larvas se produce al calentarlas a temperaturas $\geq 60^{\circ}\text{C}$ durante tiempos 10 min (Vidaček *et al.*, 2011). De igual forma, se ha comprobado que el tratamiento con microondas es más eficaz que el calentamiento convencional para producir la muerte de las larvas, aunque dependerá del poder de penetración (Vidaček *et al.*, 2009b; 2011). Sin embargo, las condiciones de tiempo-temperatura recomendadas actualmente por la UE (60°C , 1 minuto), pueden no ser suficientes para producir la muerte de las larvas (Reglamento 1276/2011). En tal sentido, se debe tener en cuenta que dependiendo de las características del producto y del sistema de calentamiento aplicado, la transmisión de calor varía, lo que implica una modificación del tiempo necesario para alcanzar la temperatura suficiente para producir la muerte de las larvas.

En condiciones de acidez, como las que se emplean en la elaboración de boquerones en vinagre, se ha observado que no se produce la muerte de las larvas, aunque en algunos casos se aprecian modificaciones en la cutícula en función al tiempo de conservación, tanto en larvas refrigeradas como congeladas (Solas *et al.*, 2009).

El efecto de altas presiones también ha sido estudiado, las condiciones mínimas en las que no se detecta movimiento de las larvas es a presiones ≥ 200 MPa y tiempos ≥ 1 minuto. Sin embargo, se han observado roturas en la cutícula de larvas y modificaciones en el músculo, que se manifiestan con más intensidad al incrementar las condiciones de tiempo-presión del tratamiento (Vidaček *et al.*, 2009c).

Efecto en alérgenos

Se ha estudiado la actividad antigénica y alergénica en pescado infestado y larvas aisladas después de aplicar los tratamientos citados. Se han detectado por inmunodetección y por inmunohistoquímica utilizando antisueros generados por inmunización de conejos con Ani s 4 recombinante o con extracto crudo de *A. simplex*. Los antígenos y alérgenos del extracto crudo se detectaron después de

aplicar la mayoría de los tratamientos ensayados, y los de *Anisakis* 4 en todos los tratamientos, incluso en las condiciones más extremas empleadas de acidez, calor altas presiones y tratamiento con pepsina en medio ácido (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010; Solas *et al.*, 2009; Vidaček *et al.*, 2010).

Por inmunohistoquímica, también se ha detectado *Anisakis* 4 y otros antígenos en músculo de pescado en zonas cercanas a las larvas, incluso si las larvas están encapsuladas, que pudiera ser debido a la excreción-secreción por el parásito de alérgenos con actividad proteasa o inhibidora de proteasa al entrar al músculo o a su liberación al producirse roturas o modificaciones de la permeabilidad en la cutícula (Solas *et al.*, 2008; 2009; Vidaček *et al.*, 2009a; 2011).

En el proyecto ANITRAT, se ha puesto a punto una técnica de extracción y detección de alérgenos parasitarios a partir de muestras de pescado, que ha dado lugar a la patente española antes citada: *Método de extracción y detección de antígenos de Anisakis en alimentos destinados al consumo humano o animal* (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2011).

El trabajo de investigación que se presenta forma parte del proyecto coordinado y financiado por el Plan Nacional del I+D+i AGL2009-12485-C03-01 Detección e identificación de *Anisakis* sp. y sus alérgenos en pescados y productos de la pesca destinados al consumo humano y animal. Aplicación de tratamientos selectivos y efecto sobre los alérgenos de *Anisakis* de distintas especies y origen (ANIDET), coordinado por la Dra. Margarita Tejada Yábar, Profesora de Investigación del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Departamento de Productos, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Madrid, España. El proyecto consta de tres sub-proyectos enfocados a tratamientos tecnológicos (Sub-proyecto 1), alergenicidad de los parásitos y músculo parasitado (Sub-proyectos 1 y 3) e identificación de especies de parásitos (Sub-proyecto 2). Con la finalidad de evaluar la influencia de los tratamientos, de la especie y del hábitat, los sub-proyectos utilizan técnicas conjuntas en partes específicas del proyecto general.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

El objetivo general fue diseñar estrategias para disminuir o eliminar la presencia de antígenos de *Anisakis* spp. en pescado y productos de la pesca infestados con larvas L3. Para ello se han planteado los siguientes objetivos parciales.

- Verificar si las técnicas de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* habitualmente utilizadas en pescado y productos de la pesca, son aplicables en condiciones más extremas de conservación o tratamiento.
 - Evaluación de diferentes condiciones de extracción (sonicación, digestión, umbral de detección) de proteínas alergénicas.
 - Evaluación de las técnicas de detección de alérgenos en condiciones prolongadas de conservación y tratamiento de pescado y productos de la pesca infestados. Efecto en la extracción y detección de alérgenos.
- Aplicar tratamientos específicos encaminados a disminuir o eliminar la actividad alergénica en pescado infestado con larvas L3.
 - Aplicación de altas temperaturas en pescado infestado durante tiempo prolongado (condiciones de simulación de tratamientos térmicos de esterilización industrial).
 - Aplicación de la tecnología utilizada en la industria de la pesca en la elaboración de surimi y geles tipo *kamaboko* elaborados con pescado infestado. Detección y evaluación de alérgenos en las siguientes etapas del proceso:
 - Lavado del músculo.
 - Adición de crioprotectores.
 - Conservación en refrigeración y congelación.
 - Efecto térmico en la elaboración de geles.

3 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

3.1 Recepción de muestras de trabajo

Las especies de pescado en estudio y las larvas vivas L3 de *Anisakis* fueron recepcionadas en las instalaciones del Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN) en Madrid, y suministradas por el Mercado Central del Pescado (Mercamadrid) y/o por el Centro Tecnológico de la Pesca (CETPEC) en Celeiro, Vigo, España. Todas las muestras de pescado fueron transportadas con hielo y en cajas de poliestireno y se conservaron en el ICTAN con hielo en cámara frigorífica a $2\pm1^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Las larvas vivas también fueron conservadas en refrigeración ($5\pm1^{\circ}\text{C}$) hasta su posterior uso.

Para estandarizar la etapa de recepción de muestras se elaboró un protocolo interno (PT-DPROD-MTY-28-ICTAN), en donde se establecieron los pasos a seguir en planta piloto y se adjuntaron las hojas de datos correspondientes a la identificación y al seguimiento de las muestras. A continuación se describe brevemente los pasos seguidos y en la Figura 3.1 se presentan algunas imágenes de la etapa de recepción y tratamiento de muestras en la planta piloto.

Paso 1: Recepción del pescado y *Anisakis*

- Datos iniciales de recepción de muestras (procedencia, fecha, hora).
- Control de temperatura (caja y pescado), peso (total y unidad) y longitud.
- Preparación y entrega de muestras de larvas de *Anisakis* para el Museo Nacional de Ciencias Naturales (MNCN) (Sub-proyecto 2) y para el Hospital Carlos III (CIII) (Sub-proyecto 3).

Paso 2: Limpieza del pescado

- Fileteo de los pescados, retirando cabeza, cola y espina. Se anota el peso del filete.

68

Paso 3: Infestación artificial

- Infestación artificial de los filetes dependiendo del grado de infestación natural y peso (Tasa de infestación artificial: n° larvas/100 g músculo).
- Almacenamiento en refrigeración a 3-5°C de las muestras infestadas, durante un tiempo igual o superior a 48 horas según corresponda (# Cámara y tiempo de infestación).

Paso 4: Distribución, envasado y almacenamiento de las muestras

- Distribución de las muestras infestadas de acuerdo a la cantidad (g) promedio a utilizar en cada experimento.
- Envasado al vacío de cada lote.
- Congelación y almacenamiento de las muestras a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso (# Cámara y fecha congelación).

Dependiendo del experimento a realizar, se trabajó con las siguientes muestras:

- Larvas vivas de *Anisakis*
- Merluza (*Merluccius merluccius*)
- Patudo (*Thunnus obesus*)
- Rabil (*Thunnus albacares*)

Posteriormente, en los Apartados correspondientes se describirán específicamente la obtención y elaboración de las muestras utilizadas para cada experimento.

3.2 Metodología empleada en el análisis de las muestras

3.2.1 Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

La identificación de las larvas se llevó a cabo en todos los lotes de larvas L3 de *Anisakis* utilizados en los experimentos. Las larvas recepcionadas fueron separadas cuidadosamente del tejido (ovarios y/o vísceras) con pinzas y sometidas a lavados sucesivos con agua destilada. Las larvas limpias vivas (refrigeradas entre 3 y 5°C) o

congeladas ($-30\pm 3^{\circ}\text{C}$) se enviaron al MNCN para su estudio genético por el Sub-proyecto 2.

La extracción de ADN fue realizada en el MNCN de acuerdo al protocolo descrito por Holmes y Bonner (1973) y modificado por D'Amelio *et al.* (2000). Cada larva fue colocada individualmente en un tubo Eppendorf de 1,5 mL y expuesta a nitrógeno líquido por algunos segundos para facilitar la ruptura de la membrana celular. El tejido fue homogenizado en mortero con 200 μL de buffer Holmes-Bonner (urea 7 M, Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 8, NaCl 350 mM, SDS 2%). Luego el ADN fue purificado en extracción con fenol-cloroformo, seguido de dos extracciones con cloroformo y una precipitación con etanol. El precipitado fue re-suspendido en 100 μL de Tris-EDTA (TE) con RNasa. La región del rADN se amplificó por PCR, se utilizaron dos tipos de cebadores A y B y se siguieron las siguientes condiciones: 10 min a 95°C , luego 30 ciclos de 30 s a 95°C , 30 s a 50°C y 75 s a 72°C , seguido por una elongación final de 7 min a 72°C . Los amplicons fueron analizados por PCR-RFLP utilizando 16 tipos de enzimas restrictivas (*AluI*, *DraI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinfI*, *HpaII*, *Hsp92II*, *MboI*, *NciI*, *PstI*, *PvuII*, *RsaI*, *SacI* y *TaqI*).

El estudio de identificación se ha llevado a cabo en todos los trabajos experimentales relativos a la presencia de larvas utilizando en cada caso una cantidad de larvas ≥ 40 .

3.2.2 Análisis elementales y pH

Se llevó a cabo, al menos por triplicado, en todas las especies de pescado antes de ser sometidas a tratamiento. Los resultados de los análisis elementales se expresan en gramos por kilogramo de músculo (g kg^{-1}) o en porcentaje (%) según corresponda.

3.2.2.1 Humedad

Se realizó de acuerdo al método descrito por la AOAC (2005).

3.2.2.2 Proteína bruta

Se midió por el método de Dumas en un equipo LECO FP-2000 (LECO Corp., St Joseph, MI, USA), utilizando 6,25 como factor de conversión de nitrógeno a proteína.

3.2.2.3 Cenizas

Se utilizó el método recomendado por la AOAC (2005).

3.2.2.4 Grasa bruta

Se determinó por el método descrito por Smedes (1999) (Karl *et al.*, 2012).

3.2.2.5 pH

El pH se determinó según la técnica descrita por Vyncke (1981) en un pH metro Metrohm modelo 827 pH lab (Metrohm AG, Herisau, Suiza).

3.2.3 Evaluación y cuantificación de las modificaciones de las proteínas del músculo de pescado

Las determinaciones de proteína para los análisis descritos a continuación, se realizaron por el método de Dumas previamente descrito (3.2.2.2) y se llevaron a cabo por triplicado.

3.2.3.1 Proteína soluble en soluciones salinas

Con la finalidad de estudiar la evolución de la proteína durante el tiempo de almacenamiento, se determinó el contenido de proteína soluble en soluciones salinas (PS/PT) (Ironsides y Love, 1958). Los resultados se expresan en miligramos de proteína soluble o insoluble por gramo de músculo (mg g^{-1}) o porcentaje de proteína soluble respecto a proteína total (%PS/PT).

El músculo de pescado fue homogenizado en un omnimixer (Omni mixer ES Homogenizer S/N ES-231, Omni International, Kennesaw, GA 30144, USA) con NaCl 5% (pH 7) (1:2, p:v) durante 1 minuto a 7500 r.p.m. en baño de agua con hielo.

El homogenizado se transfirió a un tubo y se centrifugó (Centrífuga Heraeus Multifuge 3L-R, Kendro Laboratory Products, Alemania) a 3000 x g durante 30 minutos a una temperatura entre 0 y 5°C.

El precipitado obtenido se lavó nuevamente con NaCl 5% (pH 7) (1:2, p:v) y se centrifugó a 3000 x g durante 30 minutos (0-5°C). Para precipitar las proteínas, se adicionó TCA al 15% (1:10, v:v) y se centrifugó en las condiciones descritas previamente. Se recuperó el precipitado final y se determinó el contenido de proteína por Dumas.

Los sobrenadantes obtenidos de los lavados anteriores fueron llevados a 100 mL con agua destilada. Para precipitar la proteína se tomó una alícuota de 10 mL, se adicionó TCA al 60% (10:1, v:v) y se centrifugó a 3000 x g durante 15 minutos (0-5°C). La proteína precipitada se midió por Dumas.

3.2.3.2 Extracción de actomiosina natural

La extracción de actomiosina (NAM) se realizó siguiendo el método de Kawashima *et al.* (1973). Todas las operaciones durante la extracción de los sobrenadantes y NAM se realizaron en baño con agua y hielo y/o manteniendo una temperatura entre 0 y 5°C.

3.2.3.2.1 Sobrenadantes

El músculo de pescado fue homogenizado con buffer fosfato pH 7,5 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,38 mM y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15,5 mM) (1:5, p:v), centrifugado a 3900 x g durante 15 minutos (RC 5B centrifuga refrigerada, Sorvall Instruments, DuPont, Wilmington, Del., USA) y el precipitado fue lavado dos veces siguiendo el proceso descrito anteriormente.

Los sobrenadantes (S) obtenidos en tres lavados sucesivos con buffer fosfato (S1 a S3) fueron recolectados, ajustado el volumen a 80 mL con tampón fosfato y conservados en refrigeración ($\leq 5^\circ\text{C}$, ≤ 60 min) para su estudio electroforético (SDS-PAGE). Se determinó el contenido de proteína de cada sobrenadante ajustado.

3.2.3.2.2 Extracción de NAM

El precipitado de la etapa anterior fue homogenizado en un omnimixer con NaCl 0,8 M pH 7,5 (1:3, p:v) a 6000 r.p.m. durante 3 minutos. Se transfirió el homogenizado a un vaso de precipitados y se mantuvo en reposo durante 2 h, luego se centrifugó a 5000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido fue diluido con 10 volúmenes de agua fría (0-5°C) y para favorecer la precipitación de la proteína se dejó en reposo en refrigeración durante 20 minutos. La capa superior fue separada y el resto, proteína suspendida en agua, se centrifugó durante 15 minutos a 5000 x g. Se descartó el sobrenadante y al precipitado se añadió NaCl 3 M (50 mM Tris maleato pH 7,0) para ajustar la concentración de sal hasta NaCl 0,6 M. Finalmente, la mezcla se dializó (Dialysis tubing, Size 6, Diameter 21,5 mm, MW cut-off 12-14 kDa, Medicell International Ltd., London) con NaCl 0,6 M (50 mM Tris maleato pH 7,0) durante 24 horas en cámara de refrigeración. Se determinó la concentración de proteína aislada expresando el resultado en miligramos de NAM por gramos de músculo (mg g^{-1}).

3.2.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para el estudio electroforético (SDS-PAGE) se siguió la técnica de Hames (1985). Para poder comparar las bandas obtenidas, en todas las muestras se ajustó la concentración de proteína a 5 mg mL^{-1} , con excepción de los sobrenadantes obtenidos en la extracción de actomiosina.

La electroforesis se llevó a cabo empleando un equipo PhastSystem horizontal (Pharmacia Biotechnology AB, Uppsala, Suecia) usando geles de poliacrilamida de 12.5%. Las muestras tratadas con SDS (25 g L^{-1} SDS y $0,02 \text{ g L}^{-1}$ de azul de bromofenol) o SDS + β -mercaptoetanol (β -ME, 50 mL L^{-1}) fueron calentadas durante 5 minutos en un baño de agua a 100°C. Las condiciones de electroforesis fueron de 4 mA por gel, 250 V y 3 W. Las bandas de proteínas se tiñeron con azul brillante de Coomassie (Pharmacia LKB Biotechnology AB). Las masas moleculares de las proteínas en las muestras se calcularon mediante la comparación de su movilidad con la de un estándar comercial (Full Range Rainbow Recombinant Protein Molecular Weight Marker, Amersham GE Healthcare UK Limited, Reino Unido) compuesto por

miosina (220 kDa), fosforilasa b (97 kDa), seroalbúmina bovina (66 kDa), ovoalbúmina (45 kDa), anhidrasa carbónica (30 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa) y lisozima (14,3 kDa).

3.2.4 Evaluación de la textura y color en geles

3.2.4.1 Análisis de penetración

Se realizó el análisis de penetración hasta ruptura en los geles obtenidos de surimi con la finalidad de determinar la resistencia en función al tratamiento aplicado. Todos los ensayos se realizaron en geles de 30 mm de altura y 30 mm de diámetro atemperados a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$. Para realizar las determinaciones se utilizó un Analizador de Textura TA-XT (Texture Technologies Corp., Scarsdale, NY, USA), provisto de un vástago de 0,5 cm de diámetro con punta esférica. La célula de carga empleada fue de 50 N y la velocidad de movimiento del cabezal de $0,2\text{ mm s}^{-1}$ (Moreno, 2009). Se midió la fuerza a rotura (FR) (N), deformación a rotura (DR) (mm) y la resistencia del gel (RG) que es el producto entre los dos y se expresa en N mm. Todas las determinaciones se llevaron a cabo al menos por triplicado.

3.2.4.2 Medida instrumental de color

La determinación instrumental de color se determinó usando una escala CIELab (Young and Whitte, 1985; Park, 1995) con un colorímetro (Chroma Meter, MINOLTA). Se determinaron la luminosidad (L^*), valores de a^* : la tendencia al rojo ($+a^*$) o verde ($-a^*$) y valores de b^* : la tendencia a amarillo ($+b^*$) o azul ($-b^*$). Todas las determinaciones se llevaron al menos por triplicado.

3.2.5 Evaluación por microscopía electrónica de barrido

Para microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy: SEM), se cortaron pequeños bloques de tejido (1,5-2,0 mm de lado) de todas las muestras infestadas y de las muestras sometidas a los distintos tratamientos (músculo, surimi o geles). Las muestras fueron fijadas inmediatamente con una mezcla

(1:1, v:v) de paraformaldehído (40 g L^{-1}) y glutaraldehído (2 mL L^{-1}) en tampón fosfato $0,1 \text{ M}$ (pH 7,2) y se almacenaron en refrigeración ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) hasta su envío (≤ 2 días) al ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica (CNME), Universidad Complutense de Madrid (UCM). El estudio se realizó por los integrantes del Sub-proyecto 1 a partir de muestras preparadas en nuestro Departamento (ICTAN) siguiendo el protocolo descrito.

Para su observación por SEM, las muestras fueron fijadas con OsO_4 , lavadas, deshidratadas en concentraciones crecientes de acetona, secadas mediante punto crítico, recubiertas por pulverización catódica con oro-paladio en una metalizadora (SCD 040, OC Oerlikon Balzers Ltd., Principality Liechtenstein) y analizadas por SEM (Jeol JSM 6400, Akishima, Tokio, Japón) a 20 kV . Se tomaron un gran número de micrografías con el fin de seleccionar las más representativas.

3.2.6 Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

Los alérgenos presentes en las muestras pueden determinarse de varias formas, y en todas ellas las herramientas fundamentales son dos antisueros específicos desarrollados en el CIII (Sub-proyecto 3). El primero de ellos identifica específicamente el alérgeno Ani s 4 (9 kDa), mientras que el segundo detecta varios antígenos de un extracto crudo de *A. simplex* de pesos moleculares entre 10 y 250 kDa . Se ha demostrado que mediante la técnica de inmunodetección por WB se consiguen separar las proteínas presentes en función a su peso molecular y que el uso de estos antisueros es mucho más sensible que una mezcla de sueros de pacientes sensibilizados frente a *A. simplex*, logrando durante el desarrollo del ensayo una mayor intensidad del color en menos tiempo (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010).

En tal sentido, debido a la magnitud de los ensayos y a la cantidad de muestras a analizar, el estudio de la actividad antigénica y alérgica por inmunodetección se realizó con antisueros de conejo (IgG) de Ani s 4 recombinante y de extracto crudo de *A. simplex*. Posteriormente, una vez establecidas las condiciones y parámetros del

tratamiento tecnológico no se descarta la posibilidad de utilizar sueros de pacientes sensibilizados para los estudios inmunológicos.

3.2.6.1 Antígenos y antisueros empleados

Para el estudio de los alérgenos de *Anisakis* por inmunodetección e inmunohistoquímica, los antígenos y antisueros utilizados fueron preparados por los componentes del Sub-proyecto 3 (CIII). El extracto crudo antigénico de *A. simplex* se obtuvo después de triturar en un mortero larvas recogidas manualmente (García *et al.*, 1997), mientras que Ani s 4 recombinante se obtuvo en un sistema bacteriano (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007). Posteriormente, para la detección de antígenos de *Anisakis* y Ani s 4 en el músculo de pescado infestado, los antisueros anti-Ani s 4 recombinante y anti-extracto crudo de *A. simplex* se obtuvieron inmunizando conejos con Ani s 4 recombinante y Extracto crudo de *A. simplex* respectivamente.

3.2.6.2 Inmunodetección

Para los estudios inmunológicos, se trabajó con los antisueros descritos anteriormente. El método de extracción y detección de alérgenos de *Anisakis* utilizado es el que figura en la Patente N° 2 340 978 (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2011). Estudios previos nos indican que este método permite la extracción y detección de alérgenos de *Anisakis* en concentraciones inferiores a 1 ppm y con tasas de recuperación superiores a un 65%; sin embargo, el umbral de detección aún se encuentra en evaluación, fundamentalmente cuando las muestras se someten a distintos tratamientos tecnológicos.

3.2.6.2.1 Extracción de alérgenos en larvas de *Anisakis*

Para la extracción, las larvas L3 de *Anisakis* se mezclaron en mortero con PBS en una proporción de 1:5 (p:v), se sonicaron (Misonix XL-2000 Series, Farmingdale, NY, USA) a 17 W durante 30 segundos y se centrifugaron (Centrífuga Heraeus Multifuge 3L-R, Kendro Laboratory Products, Alemania) a 16000 x g durante 10 min a 20°C, para descartar los restos insolubles (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007). Cada extracción se llevó a cabo con diferentes lotes de *Anisakis* y al menos dos veces.

3.2.6.2.2 Extracción de alérgenos en músculo de pescado y derivados

Las muestras fueron homogenizadas en ultra-turrax T25 (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania) con solución salina (30 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 6,8) en una proporción de 1:3 (p:v). La mezcla resultante fue sonicada (Misonix XL-2000 Series) en condiciones de potencia (W) y tiempo (s) variables dependiendo del tratamiento, incubada en agitación orbital (Tube rotator Modelo SB3, Stuart, Barloworld Scientific Ltd., Reino Unido) durante 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugada (Centrífuga Heraeus Multifuge 3L-R) a 5000 x g durante 30 minutos a 20°C. Se descartó el precipitado y el sobrenadante se acidificó hasta pH<1 adicionando HCl 0,075 mM (concentración final), se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se neutralizó hasta pH 7 con NaOH. Finalmente, se centrifugó a 16000 x g por 30 minutos a 20°C. Se descartó el precipitado y en el sobrenadante (extracto) obtenido se detectó la presencia de antígenos o alérgenos del parásito.

3.2.6.2.3 Western-blot (WB)

La detección por WB se realizó por componentes del Sub-proyecto 3 a partir de las muestras preparadas en nuestro Departamento (ICTAN), siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

El extracto obtenido de *Anisakis* o músculo y derivados se diluyó 1:4 en tampón de muestra para SDS-PAGE (63,5 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 0,021% azul de bromofenol) y la mezcla se aplicó a geles al 16% de acrilamida (Moneo *et al.*, 2000b) y se desarrolló a un voltaje constante de 3,75 V cm⁻². Para las proteínas purificadas, la electroforesis se realizó en SDS-PAGE en geles pre-hechos con gradientes de 4 a 20% de acrilamida (Novex® Tris-Glycine Gels, 1,0 mm, 100 Well, 20-200 kDa, Invitrogen by Life Technologies Ltd., Paisley, UK). Estas electroforesis se desarrollaron a 20 mA constantes. En ambos casos, tras la electroforesis los geles fueron teñidos con tinción de Coomassie (0,0125% de Azul brillante de Coomassie, 50% metanol, 10% ácido acético en agua bidestilada) durante 15 minutos y destañidos hasta visualizar las bandas de proteína en solución de destañido (7,5% metanol, 10% ácido acético en agua bidestilada).

Para la inmunodetección de IgE, las proteínas sometidas a electroforesis se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (NC) por difusión pasiva durante 18 horas colocando dos membranas de 0,45 μm a ambos lados del gel de acrilamida (Moneo *et al.*, 1995). Tras la difusión, las membranas se bloquearon con una solución al 3% de Nonidet P-40 en PBS durante 30 minutos y se incubaron con una mezcla de sueros durante 18 horas. Luego las membranas se incubaron primero con una dilución 1:1000 de anticuerpos monoclonales de ratón anti-IgE humana (Ingenasa, Madrid, España) y después con anticuerpos anti-conejo de cabra marcados con fosfatasa alcalina (Biosource Int, Camarillo, CA, USA). Entre las distintas incubaciones se realizaron tres lavados durante 5 minutos con solución de lavado. Para la detección de los antígenos parasitarios se utilizaron anticuerpos policlonales anti-Ani s 4 o anti-extracto crudo de *A. simplex*.

Se utilizaron anticuerpos dirigidos al alérgeno Ani s 4 debido a sus propiedades físico-químicas de bajo peso molecular, termo-resistencia, resistencia a pepsina, a altas presiones y resistencia a tratamientos o diferentes procesos culinarios dados al pescado (Moneo *et al.*, 2005; 2007; Solas *et al.*, 2008; 2009; Vidaček *et al.*, 2009a; 2009b; 2009c; 2010; 2011; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010).

Para revelar el WB se usó el sustrato de fosfatasa alcalina BCIP-NBT (5-Bromo-4-Cloro-3-Indol Fosfato/Nitroazul de Tetrazolio; Amresco, Solom, Ohio, USA) a temperatura ambiente durante 30 minutos, finalmente se la reacción se detuvo con agua o PBS (Moneo *et al.*, 2000b). El resultado se consideró positivo cuando el patrón de las bandas de la muestra de pescado era compatible con las obtenidas para el Extracto crudo de *A. simplex*.

3.2.6.2.4 Dot-blot (DB)

La cuantificación por DB se realizó al menos por duplicado por el Sub-proyecto 3 (CIII) a partir de las muestras preparadas en nuestro Departamento (ICTAN) siguiendo el protocolo que se describe a continuación:

Para la cuantificación de las proteínas alergénicas, se aplicó 3 μ L del extracto en una membrana de nitrocelulosa y se dejó secar durante 10 minutos a 37°C. La membrana se rehidrató con PBS a temperatura ambiente en agitación durante 10 minutos. Posteriormente la membrana se incubó con antisuero de conejo anti-Ani s 4 o con antisuero de conejo anti-extracto crudo de *A. simplex* diluidos 1:1000 en solución diluyente [Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05% (TTBS)] durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Se realizaron 3 lavados sucesivos con TTBS a temperatura ambiente en agitación durante 5 minutos. Se incubó con Antisuero Anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina diluido 1:2500 en solución TTBS durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Para revelar el DB, se usó el sustrato de fosfatasa alcalina BCIP/NBT a temperatura ambiente hasta el desarrollo de la curva estándar.

Los resultados se expresan en microgramos de Ani s 4 o Extracto crudo de *A. simplex* por gramo de músculo (μ g g⁻¹).

3.2.6.3 Inmunohistoquímica (IHC)

Los antisueros empleados para los estudios de inmunohistoquímica fueron los descritos anteriormente. Las muestras infestadas y sometidas a tratamiento fueron cortadas en pequeños trozos (1,5 mm de lado) y fijadas en glutaraldehído al 0,1% disuelto en buffer fosfato salino (PBS) y se almacenaron en refrigeración (5 \pm 1°C) hasta su estudio (\leq 2 días) por componentes del Sub-proyecto 1 (CNME) utilizando los antisueros elaborados por el Sub-proyecto 3 (CIII) a partir de las muestras preparadas en el ICTAN siguiendo el protocolo descrito previamente (Apartado 3.2.6.1).

Para el estudio inmunohistoquímico las muestras fueron fijadas con PBS, deshidratadas sucesivamente en etanol, disminuyendo progresivamente la temperatura hasta -30°C, y finalmente incluidas en una resina de Lowicryl K4M (PolyScience Inc. de Washington, EE.UU.) a -30°C. La resina K4M se polimerizó en luz ultravioleta durante 24 horas a -30°C y posteriormente a temperatura ambiente durante 48 horas. La deshidratación a baja temperatura y la polimerización fue realizada en un sistema

de criosustitución (AFS, Leica, Viena, Austria). Se obtuvieron secciones ultra finas (70 nm) con un ultra microtomo (Ultracut E, Reichert-Jung, Viena, Austria), que fueron depositadas sobre en rejillas de níquel de 100 mesh. Las secciones recogidas en las rejillas fueron incubadas sucesivamente en una solución de 0,1 M de glicina en PBS y una solución al 5% de albúmina de suero bovino-BSA en PBS, e incubadas toda la noche a 4°C con antisueros de conejo anti-Ani s 4 o anti-extracto crudo de *A. simplex* diluido en PBS (1:200, v:v) y BSA al 1%. Después de lavar con PBS, las secciones se incubaron, con un anticuerpo secundario, IgG de cabra anti-conejo (80 ng mL⁻¹) conjugado con partículas de oro de 10 nm (British Biocell, Cardiff, Reino Unido) diluido en PBS (1:200, v:v) y BSA al 1%, durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de sucesivos lavados con PBS y agua bidestilada, las muestras se tiñeron con acetato de uranilo al 2% (10 minutos) y citrato de plomo Reynolds (3 minutos) y se examinaron en un microscopio electrónico (Jeol 1010, Akishima, Tokio, Japón). Los controles negativos se llevaron a cabo excluyendo el anticuerpo primario. Al mismo tiempo, los controles fueron procesados con suero de conejo no inmune en lugar de anti-Ani s 4 y anti-extracto crudo de *A. simplex*.

En los casos seleccionados se tomaron al menos cincuenta micrografías (n=50) de cada muestra. El área de la micrografía se estimó utilizando un analizador de imagen (Olympus ITEM TEM imaging platform) y se especifica para cada muestra.

Se contabilizó el número de partículas de oro (Ni) presente en esta área y se calculó la densidad (Ns) como: $Ns = Ni/Sa$ (número de partículas de oro por unidad de superficie). El estudio estadístico realizado para el recuento se describe en el Apartado 3.3.

3.3 Análisis estadístico

Todos los resultados obtenidos se presentan como promedio de al menos 3 repeticiones ($n=3$). Los datos fueron sometidos a un test de homogeneidad de varianzas de Tukey-HSD. El nivel de significación se fijó en $p<0,05$ y se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics versión 19.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.).

4 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ANTÍGENOS DE *ANISAKIS*

4 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ANTÍGENOS DE *ANISAKIS*

En el Proyecto PN I+D+i “Eficacia de distintos tratamientos tecnológicos y culinarios en la mortalidad de las larvas de Anisákidos. Efecto del tratamiento sobre el reconocimiento de los alérgenos”, ANITRAT (Proyecto AGL2005-05699-C02-02) se ha puesto a punto una técnica de extracción y detección de alérgenos parasitarios a partir de muestras de pescado, que ha dado lugar a la patente “Método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos destinados al consumo humano y animal” (Patente N° 2 340 978).

El alérgeno Ani s 4, ha sido considerado como idóneo para ser estudiado en el reconocimiento de alérgenos, debido a que se trata de una proteína de bajo peso molecular (9 kDa), estable al ácido, pepsina y alta temperatura y ser un alérgeno que se ha relacionado con episodios de anafilaxia, y que se estima que es reconocido por el 27% de los pacientes alérgicos a *Anisakis* (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010).

Sin embargo, con la finalidad de valorar la sensibilidad y precisión del método de extracción de antígenos de *Anisakis*, es indispensable determinar el tipo y tasa de alérgenos en condiciones controladas, en las que se conocen las condiciones iniciales de la muestra. Es evidente que en condiciones naturales de infestación no es posible obtener muestras homogéneas que permitan efectuar estudios comparativos para determinar la eficacia del tratamiento o la precisión de la medida.

En este sentido, se han efectuado trabajos comparativos sobre muestras con infestación natural controlada (tasa de infestación determinada visualmente) e infestación artificial de igual tasa de infestación, para poder evaluar las modificaciones en el reconocimiento de los alérgenos, así como determinar el grado de detección del método en los distintos tratamientos.

Para el desarrollo de los experimentos de este Apartado, se ha establecido como punto de partida la metodología planteada en la Patente N° 2 340 978, aplicando ciertas modificaciones en algunos parámetros o incluyendo pasos en la extracción de las proteínas antigénicas.

4.1 Modificación de los parámetros de sonicación

La sonicación, considerada como una técnica de fraccionamiento subcelular, consiste en la aplicación de ultrasonidos a una suspensión celular. La intensa agitación producida genera millones de burbujas microscópicas, las cuales se expanden y colapsan contra las células causando la ruptura de las membranas celulares. Dependiendo de la frecuencia, intensidad y energía aplicada se pueden destruir las estructuras subcelulares e incluso solubilizar complejos proteicos. Se suele aplicar en frío para evitar el sobrecalentamiento de las muestras que podría provocar la desnaturalización de las proteínas (Cooper, 1996; Clarkson *et al.*, 1993).

Los métodos y técnicas de fraccionamiento subcelular tienen como objetivo obtener fracciones puras o enriquecidas en un determinado componente celular, ya sea éste un orgánulo, una fracción de membrana o complejos multiproteicos (Cooper, 1996). Se ha establecido que todo proceso de fraccionamiento subcelular tiene dos etapas, la primera que corresponde a la rotura de las células o tejidos para obtener un lisado celular o tisular en el que la fracción deseada se encuentre en condiciones adecuadas para su purificación; y la segunda que consiste en una separación de la fracción deseada del resto de componentes de la célula o del tejido (Clarkson *et al.*, 1993).

El primer paso en la purificación de la mayoría de las proteínas y estructuras subcelulares es la rotura de los tejidos o de las células para obtener un lisado celular en el que la proteína o el complejo multiproteico se encuentre en condiciones que permitan su aislamiento (Darnell *et al.*, 1993). Esto se consigue empleando procedimientos mecánicos suaves conocidos generalmente como homogenización.

La etapa de extracción de proteínas alergénicas de *Anisakis*, se inicia con la adición a la muestra de una solución hipotónica seguida de una homogenización. Ambos pasos tienen como objetivo fracturar las membranas celulares y liberar el contenido del citoplasma o de las fibras musculares. La posterior sonicación del homogenizado permite liberar con mayor eficacia las proteínas antigénicas (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2011).

4.1.1 Objetivo

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la sonicación en la extracción y detección de proteínas antigénicas y alergénicas a partir de músculo con infestación natural controlada. Se tuvieron en cuenta diferentes condiciones de potencia (W) y tiempo de sonicación (s) durante la extracción de proteínas para inmunodetección.

4.1.2 Diseño del experimento

El esquema del experimento se presenta en la Figura 4.1.

4.1.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Pescado utilizado

Para la realización del estudio se utilizaron merluzas (*Merluccius merluccius*) capturadas en la zona de Pesca FAO 27 en junio del 2010, seleccionadas en Mercamadrid y posteriormente enviadas al ICTAN. La longitud y el peso de los individuos fue $44,25 \pm 1,32$ cm y $0,92 \pm 0,02$ kg respectivamente. Se recibió un lote de 6 merluzas que fueron descabezadas y evisceradas. Para el estudio inicial sólo se utilizaron 2 merluzas, de las cuales se utilizaron los músculos dorsales. El resto de individuos del lote se conservaron en congelación ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$) para su uso en otros experimentos. La temperatura durante el transporte y manipulación de las muestras fue $\leq 5^\circ\text{C}$, y se siguió el Protocolo de recepción de muestra descrito en el Apartado 3.1.

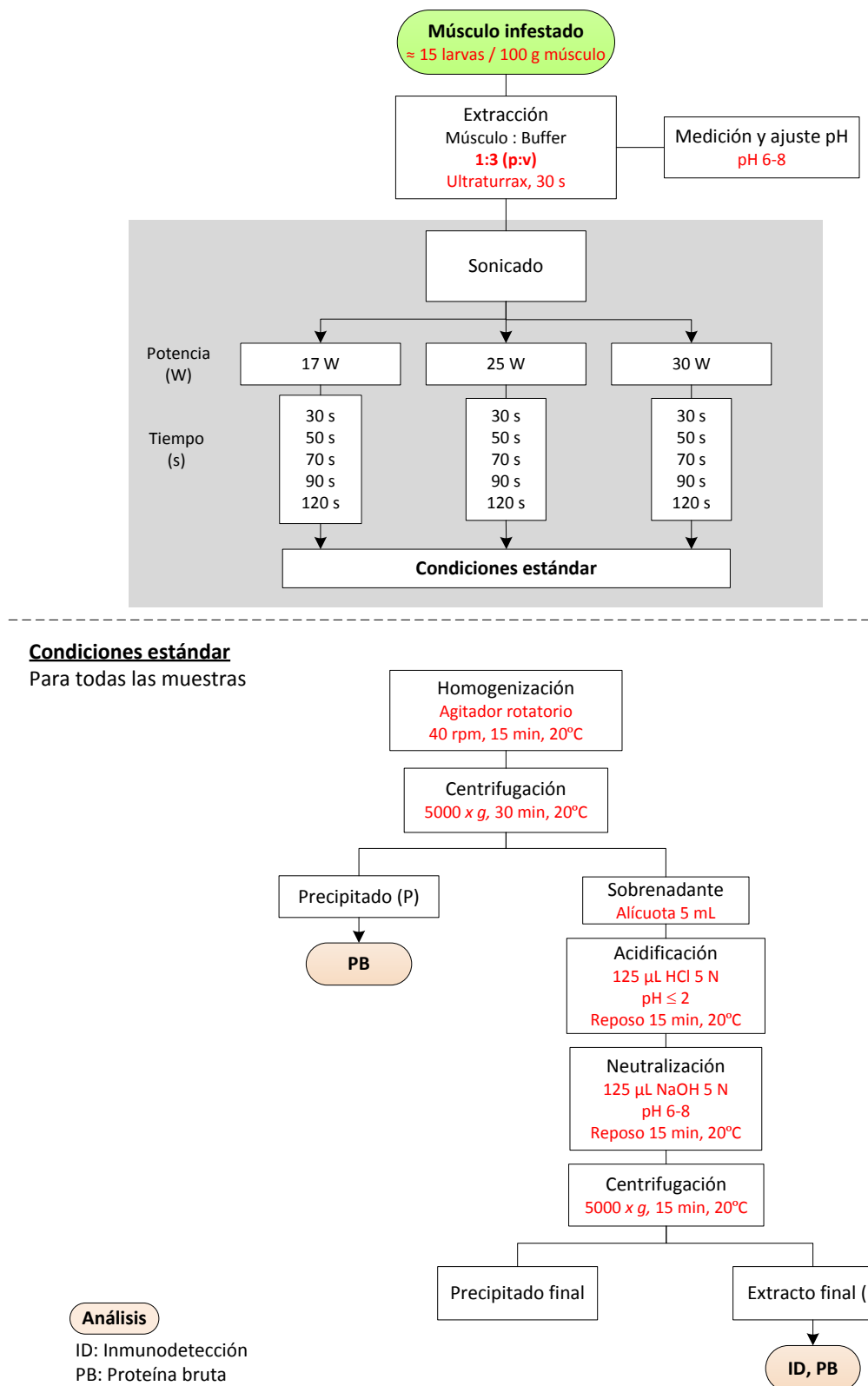


Figura 4.1 Esquema de la modificación de los parámetros de sonicación durante la extracción de proteínas para inmunodetección de músculo de merluza con infestación natural controlada (≈15 larvas/100 g músculo).

Debido a la baja tasa de infestación natural (≤ 5 larvas/100 g músculo) de los músculos dorsales seleccionados y con el fin de obtener resultados fiables al realizar los tratamientos comparativos, se utilizaron musculaturas ventrales de otros individuos. Los músculos ventrales infestados fueron obtenidos de merluzas capturadas en noviembre del 2009, procedentes de la zona de pesca VIa-FAO 27, recepcionados en las instalaciones del ICTAN, envasados a vacío y almacenados en congelación ($-30\pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta su posterior utilización. Para este experimento se utilizaron 4 músculos ventrales (2 izquierdos y 2 derechos) previamente descongelados en cámara a $\leq 5^{\circ}\text{C}$.

Preparación de la muestra

En una batidora-picadora (Hand processor accesory, Minipimer 5, Braun GmbH, Alemania) se obtuvo una mezcla homogénea (≥ 400 g) de músculo dorsal y ventral, previamente se verificó visualmente que la tasa de infestación natural fuera de 15 larvas por 100 gramos de mezcla. Para cada tratamiento, se pesaron $10\pm 0,1$ g de mezcla y se mantuvieron en refrigeración hasta proceder con la extracción de proteínas para inmunodetección.

Parte de la mezcla obtenida (≥ 100 g) se conservó en congelación a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ para su posterior estudio a los 300 días de almacenamiento.

Extracción de proteínas para inmunodetección

En la extracción de proteínas para inmunodetección se utilizó como protocolo base el descrito en el Apartado 3.2.6.2.2 (Protocolo estándar), aplicando las modificaciones descritas a continuación.

Las muestras de cada tratamiento fueron homogenizadas por separado en ultra-turrax T25 (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania) con solución salina (30 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 6,8) en una proporción de 1:3 (p:v). El tiempo de homogenización fue de 30 segundos o hasta obtener una dispersión homogénea, y con la finalidad de recoger toda la muestra, el vástago del ultra-turrax se lavó con

solución salina. Posteriormente, se verificó el pH y se ajustó entre 6 y 8 en caso de ser necesario.

Cada mezcla resultante fue sonicada (Misonix XL-2000 Series, Farmingdale, NY, USA) con diferentes combinaciones de potencia (W) y tiempo (s) (Figura 4.1). La sonicación se realizó en periodos máximos de 30 segundos, manteniendo los tubos en agua con hielo para controlar que la temperatura fuera menor o igual a 5°C. Después de la sonicación las muestras continuaron con los pasos restantes del proceso de extracción en condiciones estándar descrito en el Apartado 3.2.6.2.2. Los extractos finales (E) obtenidos fueron congelados y almacenados a $-30\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Para evaluar si las condiciones de conservación tenían incidencia en la extracción y detección de antígenos de *Anisakis*, se aplicó el mismo procedimiento a las muestras conservadas en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 300 días.

En función al tratamiento aplicado y tipo de muestra a analizar, posteriormente se seleccionó la combinación de parámetros que proporcionaron los mejores resultados en la inmunodetección de proteínas antigénicas y alergénicas.

4.1.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

Análisis elementales

Se realizaron los análisis elementales en el músculo inicial, según protocolo descrito en el Apartado 3.2.2.

Evaluación de las modificaciones en las muestras con tratamiento

Los precipitados (P) obtenidos de la extracción de proteínas para inmunodetección fueron evaluados por microscopía electrónica de barrido (SEM) (Apartado 3.2.5).

Inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

La inmunodetección (ID) de las proteínas alergénicas en las muestras iniciales se realizó utilizando la técnica de Western blot (WB), mientras que para las muestras congeladas estudiadas en el tiempo, la ID se realizó por Dot blot (DB) (Apartado 3.2.6.2).

Se determinó proteína de los precipitados (P) obtenidos de la extracción para ID. Los resultados fueron expresados en gramos por kilogramo de músculo (g kg^{-1}) (Apartado 3.2.2.2).

4.1.3 Resultados y discusión

4.1.3.1 Análisis elementales del músculo inicial

El contenido de humedad ($805,36 \pm 2,31 \text{ g kg}^{-1}$), proteína ($191,17 \pm 1,30 \text{ g kg}^{-1}$), cenizas ($13,08 \pm 0,08 \text{ g kg}^{-1}$) y grasa ($8,15 \pm 0,10 \text{ g kg}^{-1}$) del músculo de merluza se encuentran dentro de los valores reportados para esa especie (Tejada *et al.*, 2003).

4.1.3.2 Evaluación de las modificaciones en las muestras con tratamiento

En la Figura 4.2 se presentan los valores de proteína bruta de los precipitados (P) obtenidos en la extracción para inmunodetección (ID). La determinación de proteína se realizó con la finalidad de verificar si se modificaban las condiciones de extracción al variar los parámetros de sonicación. La muestra sonicada en condiciones estándar (17 W, 30 s) fue considerada como control, y obtuvo un contenido de proteína de $130,87 \pm 0,15 \text{ g kg}^{-1}$ de músculo.

Los resultados obtenidos (Figura 4.2) indican que dependiendo de las condiciones de sonicación aplicadas (potencia-tiempo) no se logró extraer mayor cantidad de proteína. Aunque es evidente que no todas las proteínas solubilizadas y cuantificadas son alergénicas, sin embargo, estos valores nos dan una referencia de la cantidad de proteína que se ha logrado obtener aplicando diferentes condiciones de sonicación.

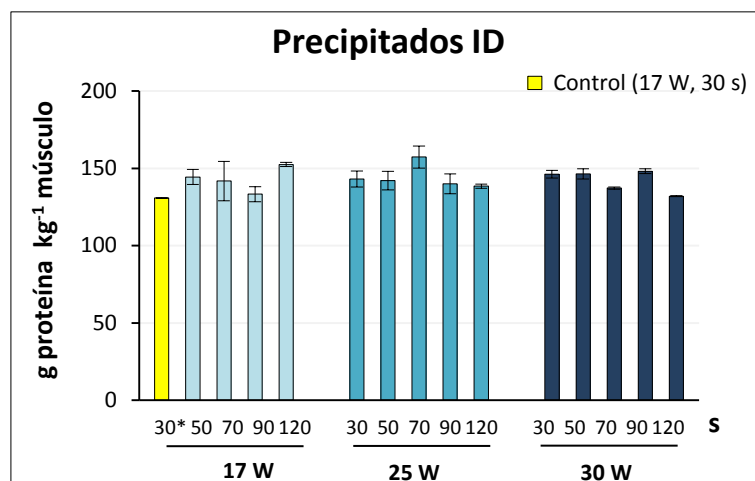


Figura 4.2 Contenido de proteína bruta (g kg^{-1}) de los precipitados (P) obtenidos en la extracción para inmunodetección (ID) a partir de músculo de merluza con infestación controlada (≈ 15 larvas/100 g músculo) y sometidos a diferentes condiciones de sonicación. **Control:** Condiciones estándar de extracción (17 W, 30 s).

En la Figura 4.3 se presentan imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de los precipitados obtenidos en la extracción para ID sometidos a diferentes condiciones de sonicación durante 30 y 120 s. En las micrografías podemos observar que conforme va aumentando la potencia y tiempo de sonicación la estructura del músculo se va modificando, rompiéndose mayor cantidad de fibras, formando redes de menor tamaño, aunque en algunos casos no se refleja en una mayor extracción de proteína.

En la micrografía correspondiente a sonicación a 25 W durante 30 s (Figura 4.3 micrografía tomada a 100 μm), aún se puede observar la presencia de una larva de *Anisakis*, lo que nos indicaría que las condiciones de sonificado aplicadas no han sido suficientes para fraccionarla en su totalidad, como se aprecia con más claridad en la Figura 4.4.

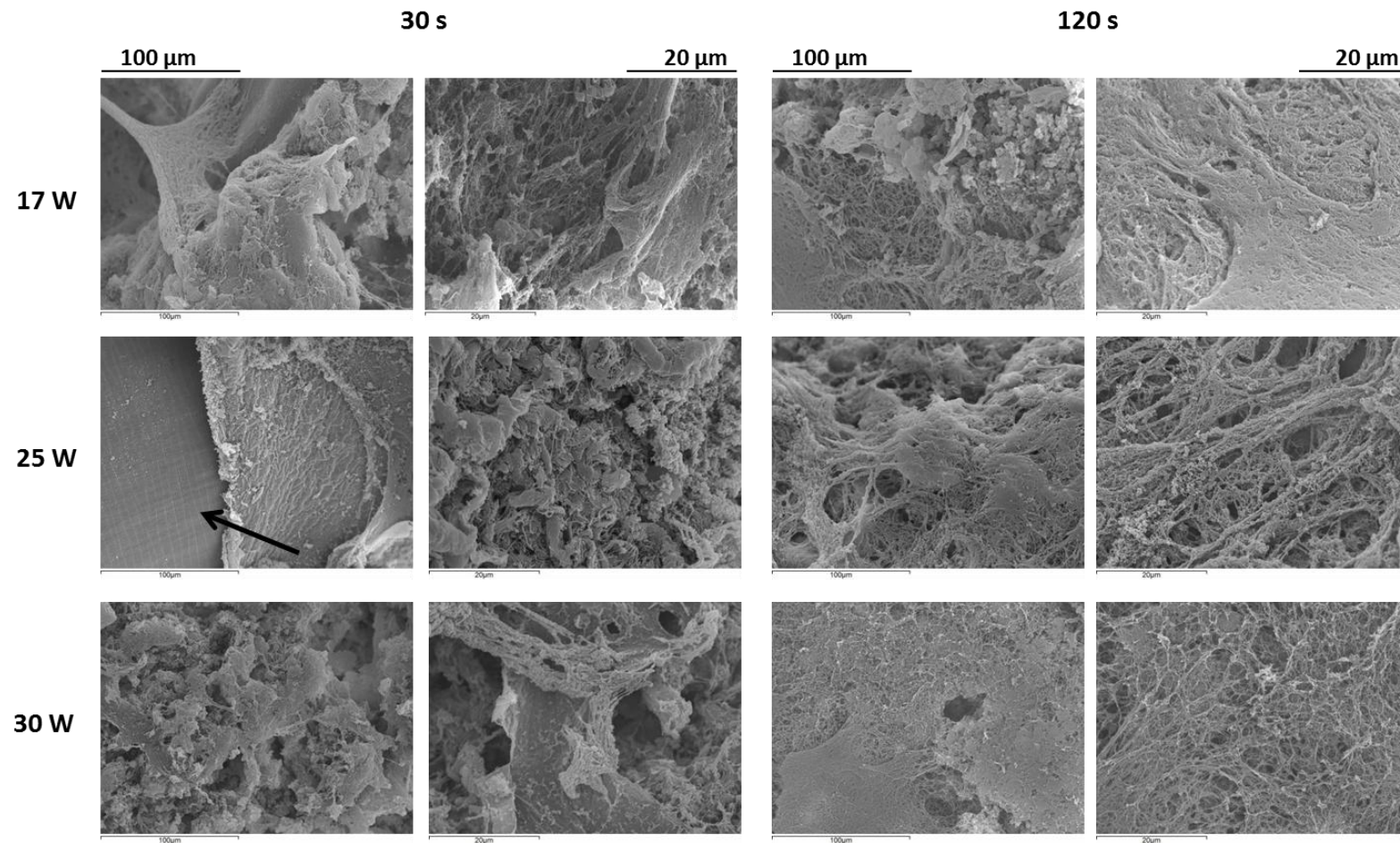


Figura 4.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de los precipitados (P) obtenidos en la extracción para inmunodetección (ID) a partir de músculo de merluza con infestación natural controlada (≈ 15 larvas/100 g músculo) y sometido a diferentes condiciones de sonicación. **Control:** Condiciones estándar de extracción (17 W, 30 s). La flecha indica la cutícula de la larva encontrada.

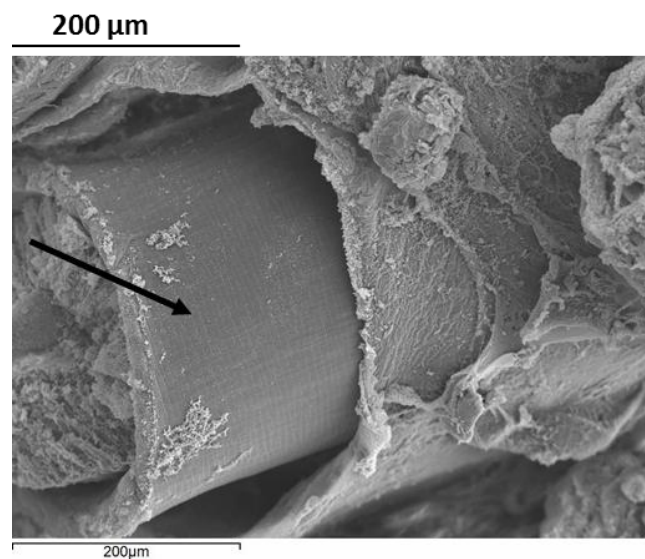


Figura 4.4 Microscopia electrónica de barrido (SEM) del cuerpo fraccionado de una larva de *Anisakis* encontrada en el precipitado (P) de músculo de merluza sonicado a 25 W, 30 s durante la extracción para inmunodetección (ID). La flecha indica la cutícula de la larva.

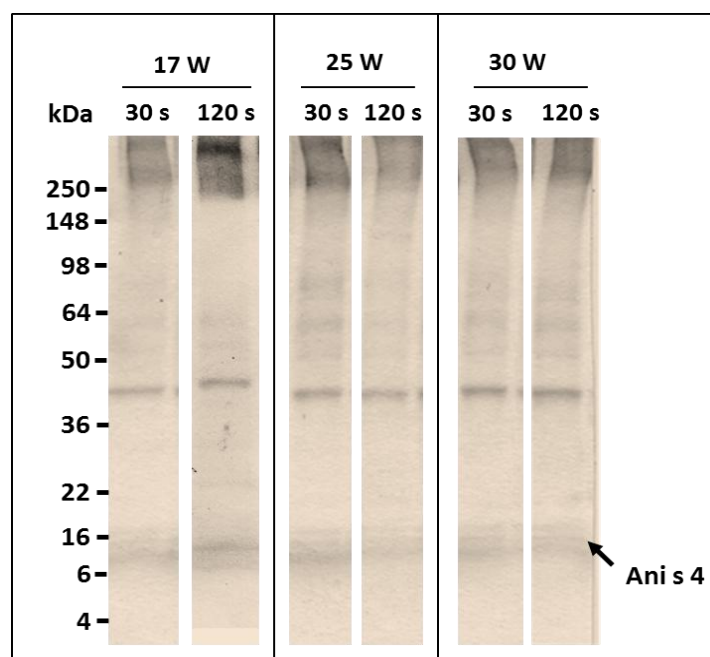


Figura 4.5 Inmunodetección por Western blot de Ani s 4 en extractos finales (E) de músculo de merluza con infestación controlada (≈ 15 larvas/100 g músculo) y sometido a diferentes condiciones de sonicación. **Control:** Condiciones estándar sonicación (17 W, 30 s).

4.1.3.3 Inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

En la Figura 4.5 se presenta la inmunodetección por WB de Ani s 4 para las muestras tratadas con distintas condiciones de sonicación. En todas las muestras sonicadas se observó la presencia de proteínas entre 36 y 50 kDa, aunque no se logró identificar a que compuestos pertenecían. No se observaron mayores cambios en la inmunodetección al incrementar las condiciones de sonicación durante la extracción, ni se evidenció la eliminación de Ani s 4 (9 kDa). Sin embargo, es importante saber si hay formación de complejos proteicos que puedan presentar respuesta antigénica.

Estudios previos han demostrado la presencia de antígenos de *A. simplex*, entre ellos el alérgeno Ani s 4, en músculo de merluza infestada y almacenada en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 11 meses (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010). Asimismo, en extractos de pescado congelado se ha comprobado la capacidad de activación de basófilos para inducir síntomas de alergia (González-Muñoz *et al.*, 2005; 2009). Se aplicaron las modificaciones de la técnica a la mezcla de músculo dorsal y ventral de merluza del lote descrito previamente, que fue conservado en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 300 días). Las condiciones de extracción aplicadas fueron las correspondientes a los tiempos de sonicación mínimos y máximos (30 y 120 s) y la inmunodetección se realizó por DB.

Como se observa en la Figura 4.6, en los extractos finales (E) no se logró detectar la presencia de Ani s 4, aunque si se detectaron y cuantificaron antígenos de Extracto crudo de *A. simplex*. La no detección de Ani s 4 podría deberse a que se encuentra por debajo del límite de detección (≤ 1 ppm).

En todas las muestras sometidas a sonicación se observó un aumento significativo de Extracto crudo de *A. simplex* respecto a la muestra control en condiciones estándar, la mayor detección la obtuvo la muestra sonicada a 25 W durante 120 segundos. Los resultados obtenidos nos sugieren que aunque no se logró detectar Ani s 4, se evidencia la presencia de otros antígenos de *Anisakis*.

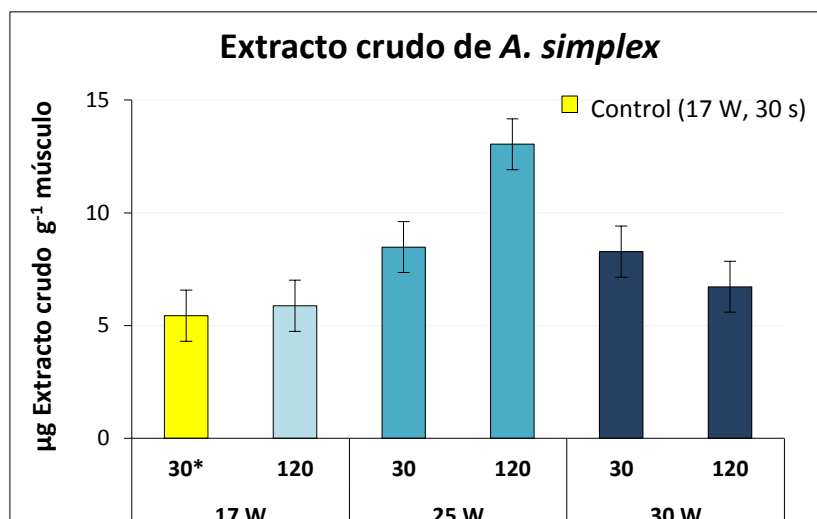


Figura 4.6 Cuantificación por Dot blot de Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) de extractos finales (E) de músculo de merluza con infestación controlada (≈ 15 larvas/100 g músculo), congelado a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 300 días y sometido a diferentes condiciones de sonicación. **Control:** Condiciones estándar sonicación (17 W, 30 s).

Se ha demostrado que en congelación se forman agregados proteicos principalmente por la formación de puentes disulfuro y enlaces covalentes no disulfuro cuyo porcentaje varía con el tiempo de conservación, este tipo de enlaces no se rompen en las condiciones utilizadas, por lo que no permiten su solubilización (Tejada, 2001; Tejada *et al.*, 2003a; 2003b). En el caso de las proteínas alergénicas como Ani s 4, se ha establecido que posee 2 residuos de Cys (Rodríguez-Mahillo, 2006), y aunque aún no se ha demostrado, podría significar la formación de un enlace disulfuro al interactuar con la matriz alimentaria o simplemente que Ani s 4 ha perdido su capacidad alergénica durante la conservación en congelación del músculo al sufrir modificaciones estructurales durante la congelación.

4.1 Digestión con pepsina

La pepsina es una enzima cuya función principal es degradar las proteínas en péptidos. Fue descubierta en 1836 por Theodor Schwann y es considerada como la principal enzima de la familia de las proteasa aspárticas, siendo la pepsina porcina una de las primeras proteínas que se cristalizó (Northrop, 1930; Fujinaga *et al.*, 1995). Como la mayoría de las proteasas aspárticas, la pepsina es sintetizada como un zimógeno inactivo. El pepsinógeno, zimógeno precursor de la pepsina, tiene la misma estructura primaria que la pepsina además de otros 44 residuos en el extremo N-terminal de la proteína. Contiene nueve residuos de lisina, dos residuos de arginina y dos residuos de histidina que hacen que el péptido sea básico. El pro-péptido forma una estructura helicoidal que se estabiliza por fuerzas electrostáticas cuando las seis cadenas laterales forman iones pares con las cadenas laterales del carboxilato de la pepsina (Palashoff, 2008).

La pepsina es más activa en ácido entre los 37°C y 42°C. Su actividad enzimática óptima ocurre a un pH de 2,0 y puede mantenerse estable y altamente activa cuando el pH baja hasta 1; comienza a perder actividad alrededor de un pH 5 mientras que su actividad se inactiva a pH cercanos a 7 (Smith *et al.*, 1991). Sin embargo, se considera que una alta concentración de pepsina (25 mg mL⁻¹) no se inactiva hasta valores de pH cercanos a 8 (Jones y Landon 2002). La actividad de la pepsina es también dependiente de la relación entre la cantidad de enzima y proteína ya que cuanto más alta es, la enzima es más eficiente (Palashoff, 2008).

La digestión es uno de los procesos obligados para muchos análisis en los que se realiza una posterior determinación de los analitos. Esta etapa previa es generalmente un paso limitante de los procesos de análisis, debido a que los tiempos de hidrólisis pueden ser demasiado largos (Herrera *et al.*, 2001). En los estudios con *Anisakis* esta técnica se ha utilizado para identificar y cuantificar la presencia de larvas, así como para evaluar su resistencia en condiciones de extrema acidez (CODEX, 2004; Solas *et al.*, 2009).

Se considera que si una proteína es estable a condiciones de proteólisis y acidez en el tracto digestivo, la probabilidad de que sea absorbida en la mucosa intestinal es elevada (Astwood *et al.*, 1996). Al respecto, se ha demostrado que las larvas L3 de *Anisakis* tienen una cutícula muy resistente a ácido y a pepsina y pueden permanecer vivas en condiciones de digestión, ya que son condiciones normales que encuentra en el aparato digestivo de los hospedadores intermediarios (Tejada *et al.*, 2007; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008). Estas condiciones se consideran incluso que son un estímulo para la muda de la larva al estado adulto (Moneo y Caballero, 2002).

Por otro lado, las larvas L3 de *Anisakis* cuando se incuban en medio ácido diluido liberan una gran cantidad de proteínas alergénicas. La liberación óptima se produce a 37°C y una concentración de HCl entre 50 y 100 mmol L⁻¹ (Moneo y Caballero, 2002).

Respecto al efecto del medio ácido y pepsina en los alérgenos, se ha comprobado que la IgE de pacientes sensibilizados reconoce alérgenos somáticos y de secreción-excreción en condiciones de pH y pepsina del estómago humano, considerándose un estímulo para su excreción. Con relación a la resistencia, se ha comprobado que algunos de estos alérgenos son resistentes a tratamientos térmicos severos y estables a la digestión en el tracto gastrointestinal (Tejada *et al.*, 2006; Solas *et al.*, 2009; Vidaček *et al.*, 2009c).

4.1.1 Objetivo

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la digestión en la extracción y la actividad de las proteínas alergénicas a partir de músculo con infestación artificial. Se consideró como variable el tiempo de digestión con la finalidad de liberar la mayor cantidad de proteína alergénica que pueda ser detectada por inmunodetección. Para inactivar la acción de la pepsina, la digestión fue detenida por neutralización y por calentamiento.

4.1.2 Diseño del experimento

El esquema del experimento se presenta en la Figura 4.7.

4.1.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Larvas de *Anisakis* spp.

Las larvas vivas de *Anisakis* en la tercera fase (L3) fueron obtenidas de ovarios y vísceras de merluzas (*Merluccius merluccius*) parasitadas procedentes del caladero de Gran Sol (Zona de pesca FAO 27) y recepcionadas en Mercamadrid en el mes de noviembre de 2011. Se utilizó un lote de aproximadamente 100 g de larvas incluyendo tejidos de ovarios y vísceras que fueron almacenadas a $5\pm1^{\circ}\text{C}$ (≤ 2 horas) hasta su posterior uso.

La identificación taxonómica se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

Pescado utilizado

Para el estudio se utilizaron merluzas capturadas en la zona de Pesca FAO 27, en noviembre del 2011. La longitud y el peso de los individuos fueron $48,0\pm0,02$ cm y $1,16\pm0,05$ kg respectivamente. Se utilizaron 2 merluzas, las cuales fueron descabezadas, evisceradas y cortadas en filetes. La temperatura durante la manipulación y conservación de las muestras fue $\leq 5^{\circ}\text{C}$. Se siguió el Protocolo de recepción de muestra descrito en el Apartado 3.1

Preparación de la muestra

Para la infestación artificial de los filetes de merluza, las larvas de *Anisakis* se colocaron entre dos capas de músculo (tipo sándwich) en una proporción de 50 larvas por cada 100 g de músculo que se distribuyeron homogéneamente en los filetes. Los filetes infestados se almacenaron en condiciones de refrigeración ($5\pm1^{\circ}\text{C}$) durante un máximo de 48 horas para favorecer la penetración de las larvas en el músculo (Tejada *et al.*, 2006) y luego fueron congelados y conservados a $-20\pm2^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

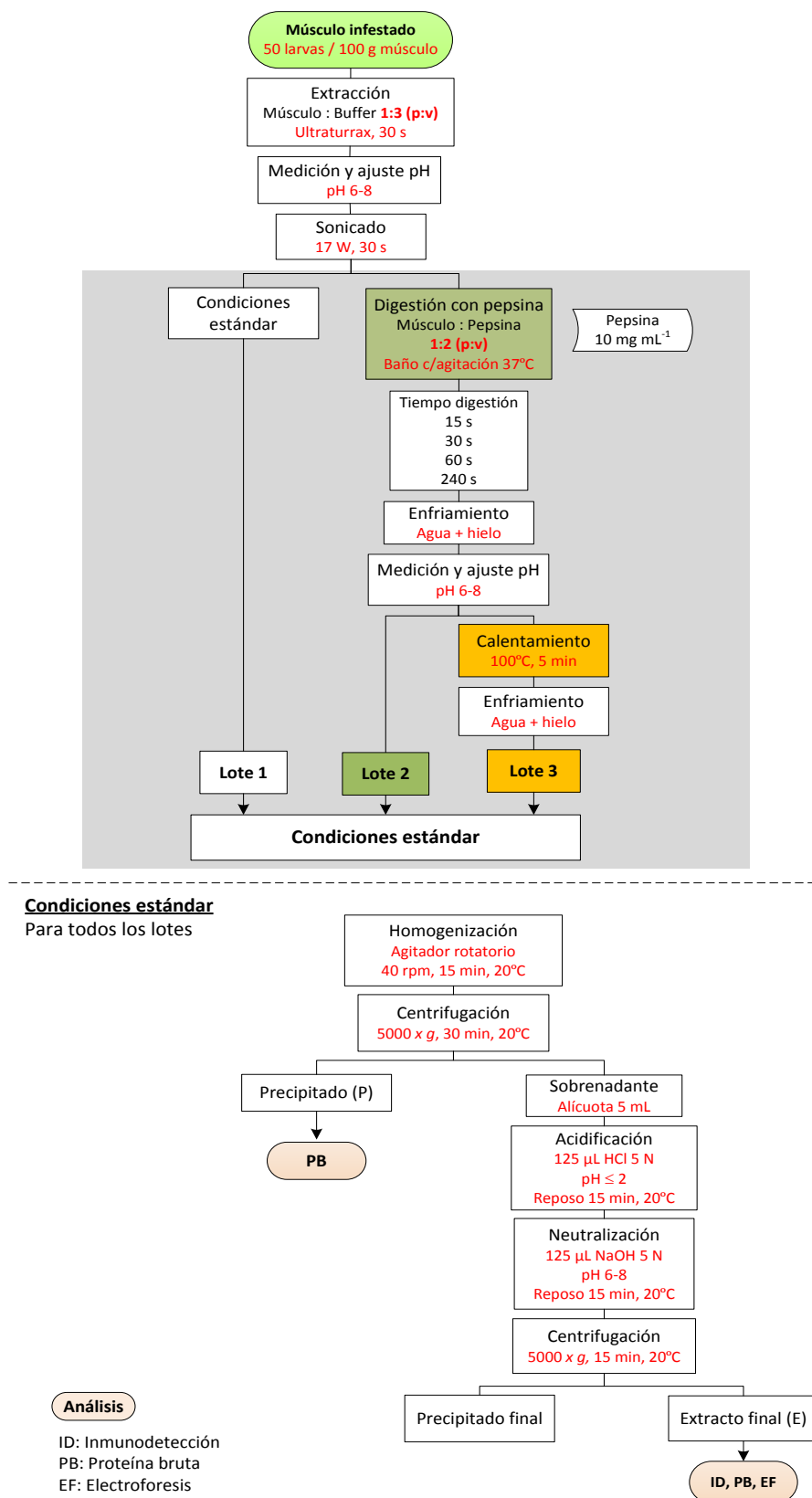


Figura 4.7 Esquema de la extracción de proteína para inmunodetección a partir de músculo de merluza con infestación artificial (50 larvas/100 g músculo) y sometidos a tratamientos de digestión y digestión más calentamiento.

Los filetes infestados, previamente descongelados, fueron troceados con cuchillo y picados en una batidora-picadora (Hand processor accesory, Minipimer 5, Braun GmbH, Alemania) hasta obtener $\cong 100$ g de una muestra homogénea.

Extracción de proteínas para inmunodetección

En la extracción de proteínas para inmunodetección se utilizó como protocolo base el descrito en el Apartado 3.2.6.2.2 (Protocolo estándar), aplicando las modificaciones descritas a continuación.

La muestra fue homogenizada en ultra-turrax T25 (Janke & Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen, Alemania) con solución salina (30 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 6,8) en una proporción de 1:3 (p:v). El tiempo de homogenización fue de 30 segundos o hasta obtener una dispersión homogénea y con la finalidad de recoger la mayor cantidad de muestra, el vástago del ultra-turrax se lavó con solución salina. Se verificó el pH y se ajustó entre 6 y 8 en caso de ser necesario. La mezcla resultante fue sonicada (Misonix XL-2000Series, Farmingdale, NY, USA) a 17 W durante 30 segundos (condiciones estándar) y distribuida en tres lotes, dependiendo del tratamiento a aplicar.

- Lote 1: Muestra estándar

La muestra sonicada continuó con el proceso de extracción de acuerdo al protocolo estándar, descrito en el Apartado 3.2.6.2.2

- Lote 2: Muestra digerida

La muestra sonicada fue sometida a digestión con solución de pepsina a una concentración final de 0,3M HCl, 10 mg mL⁻¹ pepsina [actividad proteolítica 1: 10000 NF (2000 FIP-U g⁻¹), Panreac, Castellar del Vallés, España], pH 1. La relación muestra-pepsina utilizada fue de 1:2 (p/v) (Ozanz Mur, 2001; Tejada *et al.*, 2006; Vidaček *et al.*, 2009c). Las muestras fueron incubadas en baño de agua (37 \pm 0,5°C) con agitación constante. Los tiempos de digestión fueron: 15, 30, 60 y 240 minutos. Una vez retiradas las muestras, se enfriaron inmediatamente en agua con hielo y se neutralizaron con NaOH diluido para inactivar la pepsina.

Parte de las muestras digeridas y neutralizadas fueron destinadas para el lote 3. El resto de muestras del lote 2 continuaron con el proceso de extracción a condiciones estándar descrito en el Apartado 3.2.6.2.2.

- **Lote 3: Muestra digerida y calentada**

Con la finalidad de detener la acción de la pepsina, las muestras digeridas y neutralizadas fueron calentadas a $100\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos, pasado ese tiempo se retiraron, enfriaron en agua con hielo y continuaron el proceso de extracción a condiciones estándar descrito en el Apartado 3.2.6.2.2.

Los precipitados (P) de la primera centrifugación y los extractos finales (E) de los tres lotes estudiados fueron congelados y almacenados a $-30\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

4.1.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

Para los estudios de identificación taxonómica se siguió el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

Análisis elementales y pH

Se realizaron los análisis elementales y pH del músculo inicial y los resultados se expresan en g kg^{-1} (Apartado 3.2.2).

Proteína bruta

Se determinó proteína bruta de los precipitados (P) y extractos finales (E). Los resultados se expresan en porcentaje (%) (Apartado 3.2.2.2).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Con la finalidad de evaluar las modificaciones de las proteínas al aplicar los tratamientos descritos, se realizó el estudio electroforético de los extractos finales (E) (Apartado 3.2.3.3).

Inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

Las proteínas alergénicas en los extractos finales (E) fueron cuantificadas por Dot blot (DB) (Apartado 3.2.6.2).

4.1.3 Resultados y discusión

4.1.3.1 Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

Morfológicamente las larvas fueron clasificadas como Tipo I. En el lote estudiado se identificaron *Anisakis simplex* s.s. (94,4%), *Anisakis pegreffii* (2,77%), e híbridos de ambas especies (2,77%).

4.1.3.2 Análisis elementales y pH del músculo inicial

El contenido de humedad ($806,45 \pm 0,86$ g kg⁻¹), proteína ($185,23 \pm 1,60$ g kg⁻¹), cenizas ($10,63 \pm 0,15$ g kg⁻¹) y grasa ($17,02 \pm 5,38$ g kg⁻¹) del músculo de merluza se encuentran dentro de los valores reportados para esa especie (Tejada *et al.*, 2003). El pH inicial del músculo fue de $6,76 \pm 0,02$. En especies de teleósteos marinos como la merluza, se considera que el pH final *post mortem* puede disminuir desde 6,8 hasta un pH extremo de 6,1-6,5 (Ruiz-Capillas y Moral, 2001).

4.1.3.3 Evaluación y cuantificación de las modificaciones de las proteínas del músculo de pescado

En la Figura 4.8 se representan en porcentaje los valores de proteína de los precipitados (P) y extractos finales (E) obtenidos para inmunodetección. Se realizó un control correspondiente a la extracción en condiciones estándar (sin tratamiento) a fin de poder realizar las comparaciones respectivas. Los valores de proteína encontrados en el control fueron de 4,88 y 15,91% para P y E respectivamente. En los tratamientos encontramos valores de proteína que oscilan entre 0,12 y 1,10% para los precipitados (P), y entre 21,24 y 22,84% para los extractos finales (E).

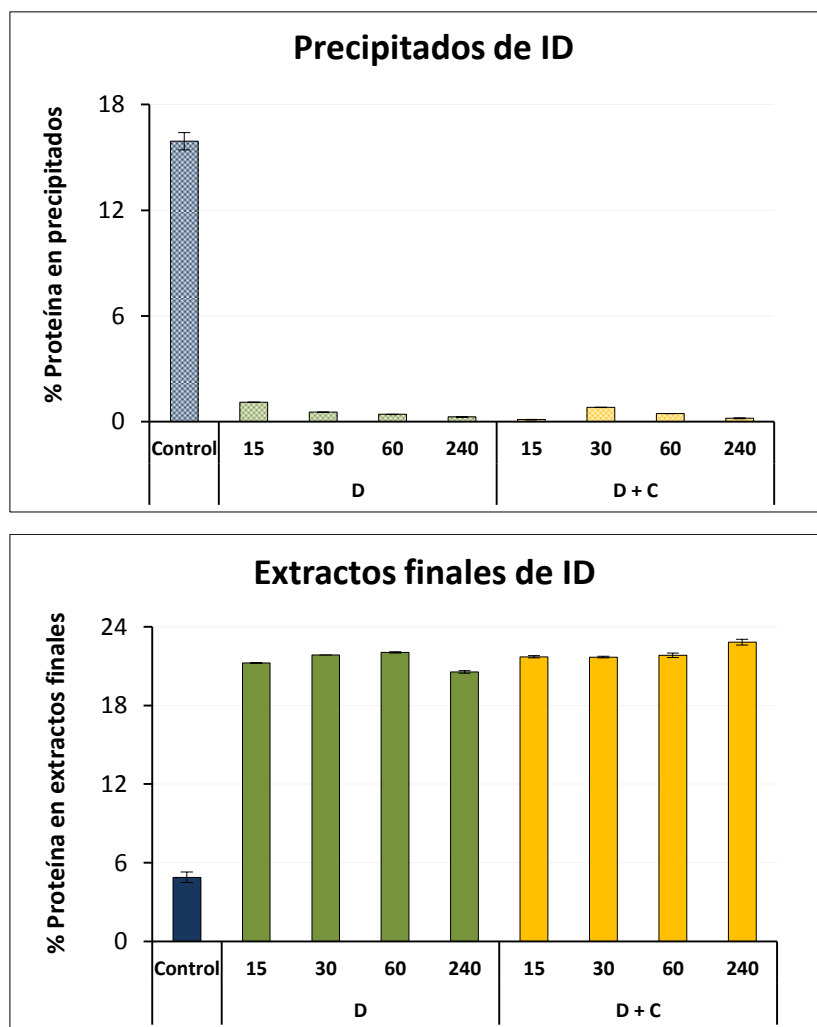


Figura 4.8 Proteína bruta (%) de los precipitados (P) y extractos finales (E) de inmunodetección (ID) sometidos a diferentes tratamientos de digestión con pepsina y digestión con pepsina más calentamiento, obtenidos a partir de músculo de merluza infestado (50 larvas/100 g músculo). **Control:** Condiciones estándar de extracción (17 W, 30 s); **Condiciones de digestión:** 10 mg mL⁻¹, pH 1; Músculo: Pepsina 1:2 (p:v) incubado a 37±0,5°C; **D:** Digestión; **D+C:** Digestión mas Calentamiento (100°C, 5 min); **Tiempo digestión (min):** 15, 30, 60, 240.

En los extractos finales (E) de las muestras con tratamiento se observó un aumento significativo de la proteína con respecto al control, mientras que entre tratamientos las diferencias no fueron significativas. La extracción en condiciones de digestión con pepsina ha permitido la ruptura de los enlaces peptídicos, posiblemente liberándose

péptidos de tamaño variable y algunos aminoácidos libres, que han provocado una mayor extracción y cuantificación del nitrógeno presente y expresado como proteína. Sin embargo, hay que considerar que el aumento de más del 90% se debe a que se ha digerido proteína miofibrilar sin actividad alergénica, por lo que la relación actividad alergénica y cantidad de proteína no da una valoración correcta.

Se realizó un primer estudio electroforético de los extractos finales (E) de ID con la cantidad de proteína ajustada a 5 mg mL^{-1} (Figura 4.9, Proteína ajustada). En estas condiciones la identificación de las bandas no se visualizó con claridad debido a que las muestras con tratamiento se encontraban muy diluidas. En un segundo patrón de electroforesis, en los que no se ajustó la proteína en los extractos (Figura 4.9, Proteína sin ajustar), se observó con mayor claridad el desdoblamiento de las proteínas de alto peso molecular a nivel de la Actina, así como una alta concentración de compuestos a nivel de 10-12 kDa. Aunque es evidente que durante el proceso de digestión se ha logrado obtener compuestos por debajo de 10 kDa, peso molecular cercano a Anis 4 ($\approx 9 \text{ kDa}$), no podemos afirmar que estas proteínas puedan ser detectadas y/o cuantificadas como alergénicas.

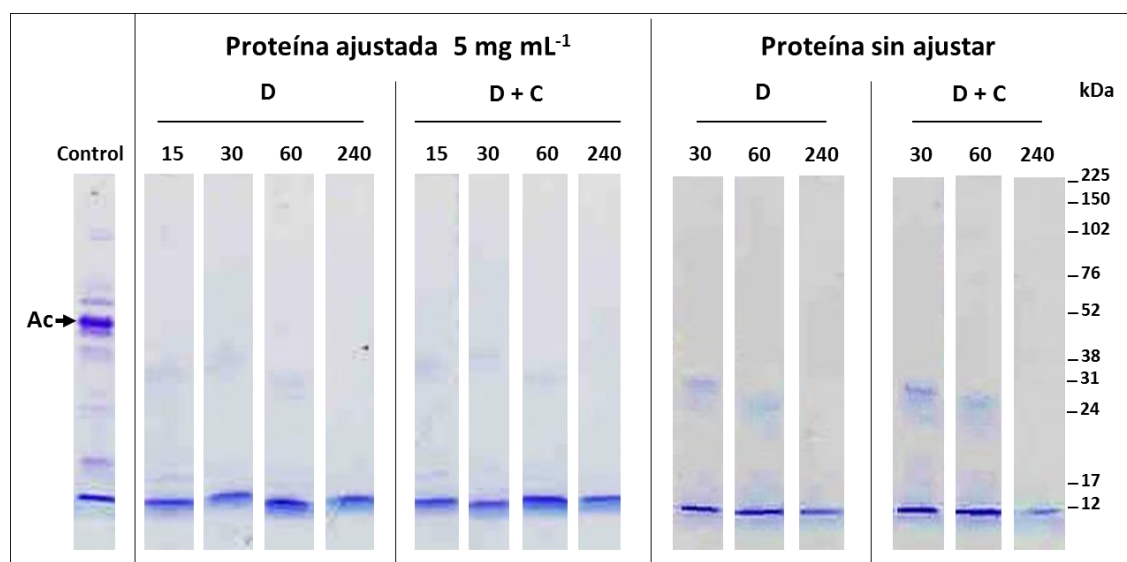


Figura 4.9 Patrón de electroforesis de los extractos de inmunodetección sometidos a diferentes tratamientos de digestión con pepsina y digestión con pepsina más calentamiento, obtenidos a partir de músculo de merluza infestado (50 larvas/100 g músculo). **Ac:** Actina.

Por otro lado, es sabido que a diferencia de Ani s 4, otros antígenos de *Anisakis* pueden llegar a tener pesos moleculares de hasta 139 kDa, como el caso de Ani s 7 que es considerado como un alérgeno principal y de alto valor diagnóstico (Rodríguez *et al.*, 2008). Al respecto, en el patrón de electroforesis prácticamente no se evidencia la presencia de compuestos con pesos moleculares superiores a 12 kDa, y probablemente este grupo de alérgenos ha sufrido proteólisis por acción de la pepsina.

En cuanto a la detección y cuantificación por DB de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* obtenidos en los extractos finales (E) (Tabla 4.1), en las muestras con D durante 15 min y D+C durante 30 y 60 min, se logró detectar un 34% de antígenos de Ani s 4, mientras que en la muestra con D+C durante 240 min la detección fue de un 86,47% con respecto al control.

Tabla 4.1 Cuantificación por Dot blot de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en extractos para inmunodetección sometidos a tratamientos de digestión y calentamiento.

Tratamiento		Ani s 4		Extracto crudo <i>A. simplex</i>	
		µg g ⁻¹	% detección	µg g ⁻¹	% detección
<i>Control</i>		<i>6,08</i>		<i>11,31</i>	
D	15	2,07	34,10	1,00	8,88
	30	N/D	N/D	N/D	N/D
	60	N/D	N/D	N/D	N/D
	240	N/D	N/D	N/D	N/D
D+C	15	N/D	N/D	N/D	N/D
	30	2,08	34,16	0,33	2,89
	60	2,08	34,16	N/D	N/D
	240	5,25	86,47	N/D	N/D

Control: Condiciones estándar de extracción; **Condiciones de digestión:** 10 mg mL⁻¹, pH 1; Músculo: pepsina 1:2 (p:v), incubación a 37±0,5°C; **D:** Digestión; **D+C:** Digestión mas Calentamiento 100°C, 5 min. **Tiempo digestión (min):** 15, 30, 60, 240; **N/D:** No detectado (≤ 1 ppm).

Aunque estudios realizados con músculo de boquerón (*Engraulis encrasicolus*) y merluza (*Merluccius merluccius*) demostraron que Ani s 4 es resistente a condiciones de acidez y digestión con pepsina (Solas *et al.*, 2009; Tejada *et al.*, 2006b; Vidacek *et al.*, 2009b), en nuestro caso no se logró identificar ni cuantificar la presencia de Ani s 4 en la mayoría de muestras digeridas, en especial en aquellas que no presentaron una etapa de calentamiento posterior.

En las muestras sometidas a un calentamiento posterior a la digestión se logró cuantificar la presencia de Ani s 4 (Tabla 4.1), considerándose este método mucho más eficaz para detener la acción de la pepsina en el músculo, coincidiendo con lo sugerido por Vidaček *et al.* (2009c).

El objetivo de incluir una etapa de digestión en la extracción de proteínas fue facilitar las rupturas de posibles enlaces entre proteínas, y que conjuntamente con la etapa de homogenización y sonicación, se liberen las proteínas alergénicas presentes en el precipitado que se obtiene en el proceso de extracción. Los resultados obtenidos nos sugieren que no es necesario incluir una etapa de digestión ya que al parecer las condiciones estándar de extracción son suficientes para lograr una extracción adecuada de las proteínas alergénicas. Sin embargo, también debemos considerar la posibilidad de que los valores obtenidos se encuentren por debajo del umbral de detección de la técnica (≤ 1 ppm).

5 APLICACIÓN DE PROCESOS TECNOLÓGICOS PARA REDUCIR O ELIMINAR LA ALERGENICIDAD

5 APLICACIÓN DE PROCESOS TECNOLÓGICOS PARA REDUCIR O ELIMINAR LA ALERGENICIDAD

En los estudios realizados en el proyecto ANITRAT, se ha logrado demostrar que las larvas de *A. simplex* mantienen su capacidad alergénica después de ser congeladas y/o sometidas a tratamientos de calor o altas presiones (Vidaček *et al.*, 2009a; 2009b; 2009c; 2010; 2011; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010) y que los antígenos y alérgenos presentes, además de encontrarse dispersos en zonas del músculo próximas al parásito (Solas *et al.*, 2008), son capaces de inducir una respuesta inmune en los pacientes (Moneo *et al.*, 2005; 2007; González-Muñoz *et al.*, 2009) en especial cuando se trata de antígenos termo-resistentes como Anis 4. Asimismo, como resultado de estos estudios se ha generado el desarrollo y patente de una técnica de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos destinados al consumo humano o animal (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2011).

En el presente trabajo de investigación se ha pretendido ampliar los logros alcanzados en ANITRAT, y con el fin de evaluar la sensibilidad y robustez del método de extracción y detección de alérgenos de la técnica patentada, se ha procedido a la extracción y detección de alérgenos en productos de la pesca sometidos a tratamientos más agresivos (congelación prolongada y tratamiento térmico de esterilización) y de esta forma valorar el potencial alergénico del pescado y productos de la pesca.

Asimismo, teniendo en cuenta la variabilidad alergénica y las características de las proteínas (peso molecular, número de grupos -SH, punto isoelectrico, etc.) de varios alérgenos descritos hasta la fecha, se han realizado estudios en sistemas modelo proteicos en donde se han aplicado tratamientos que han permitido su eliminación por precipitaciones selectivas o han favorecido la pérdida de actividad por formación de enlaces con otras proteínas del entorno (desnaturalización y agregación selectiva) aplicando un procesado similar a la que se utiliza industrialmente para la elaboración de surimi y de geles de surimi. Estos estudios se han realizado en condiciones controladas en sistemas modelo para una vez establecidos los mecanismos poder aplicar la metodología a sistemas con infestación natural.

5.1 Sistemas modelo de tratamiento térmico de esterilización en productos de la pesca

La preparación de conservas enlatadas consiste en utilizar el calor, por sí solo o junto con otros medios de conservación, para matar o inactivar todos los contaminantes microbianos, independientemente de su procedencia, y envasar al producto en recipientes cerrados que los protejan de la recontaminación (Warne, 1989).

El *Codex Alimentarius*, en su Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado en Conserva (CAC/RCP 10-1976) define el “Pescado o mariscos en conserva” como los envasados en recipientes herméticamente cerrados y calentados suficientemente para destruir o inactivar todos los microorganismos que pueden multiplicarse a cualquier temperatura a la que pueda mantenerse normalmente el producto, y que pueden originar putrefacción o ser nocivos.

Desde el punto de vista de la prevención del deterioro bacteriano del producto pesquero se debe tomar en consideración dos factores al seleccionar las condiciones del tratamiento térmico. El primero es que el producto no sea fuente de botulismo para los consumidores y el segundo que el riesgo de deterioro no patógeno se mantenga en niveles comerciales aceptables (CAC/RCP 23-1979, Rev. 1993; CAC/RCP 52-2003, Rev. 2011).

Cuando las bacterias se someten a calor húmedo a temperaturas letales, tal como ocurre durante el tratamiento térmico de las conservas enlatadas de pescado, se observa un orden logarítmico de muertes en un intervalo de tiempo dado. Se conoce como tiempo de reducción decimal o valor D al intervalo de tiempo necesario (minutos) para reducir la población de esporas en un 90% a una temperatura dada. El valor D de las esporas bacterianas es independiente de las cantidades iniciales, pero varía según la temperatura del medio de calentamiento (Warne, 1989).

En la práctica industrial, los fabricantes de conservas de pescado se dan por satisfechos si la probabilidad de supervivencia de esporas patógenas es suficientemente remota como para que no implique ningún riesgo significativo para la salud pública (Warne, 1989). Sin embargo, es necesario incorporar en el efecto esterilizador total la influencia de las demoras en el calentamiento e integrar los efectos letales de todas las combinaciones de tiempo y temperatura durante el tratamiento térmico, y expresar su suma en términos de tiempo a la temperatura de referencia. La magnitud del efecto esterilizador del tratamiento térmico se suele expresar en minutos a la temperatura de referencia de 121,1°C y se le conoce como Valor F_0 (Footitt y Lewis, 1999).

Se considera que el producto es “comercialmente estéril” si el tratamiento térmico aplicado satisface los criterios de inocuidad y prevención del deterioro no patógeno en condiciones normales de transporte y almacenamiento. Al respecto, la Comisión FAO/OMS del *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 23-1979, Rev. 1993) define la esterilidad comercial de un alimento tratado térmicamente como *“el estado que se consigue aplicando calor suficiente, solo o en combinación con otros tratamientos apropiados, con objeto de liberar a ese alimento de microorganismos capaces de reproducirse en él en unas condiciones normales no refrigeradas en las que se mantendrá probablemente el alimento durante su distribución y almacenamiento”*.

El tratamiento térmico necesario para hacer que los alimentos poco ácidos envasados sean comercialmente estériles depende de la carga microbiana, de la temperatura de almacenamiento, de la presencia de diversas sustancias conservadoras, de la actividad acuosa, de la composición de los productos y del tamaño y tipo del envase (CAC/RCP 52-2003, Rev. 2011).

Las temperaturas y tiempos seleccionados para el tratamiento en autoclave dependen del tipo de envase, del tamaño y peso del producto envasado, de la temperatura de llenado y de la presentación del producto. En general, es suficiente tratar el producto hasta unos valores F_0 de 10 a 15 minutos, sin embargo, hay evidencia de que algunos

conserveros seleccionan condiciones innecesariamente severas que dan unos valores F_0 superiores a los 30 min (Warne, 1989).

En el caso de pescado infestado por las larvas de *Anisakis*, al ser sometido a procesos industriales de cocción, esterilizado por vapor y presión en autoclaves (0,07 MPa), provoca que las larvas de *Anisakis* queden inviables. Sin embargo, se ha reportado que algunos pacientes alérgicos a *Anisakis* han presentado reacciones alérgicas de distinto grado después del consumo de pescado en conserva (Audicana *et al.*, 2002; Moneo *et al.*, 2007; AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium, 2011).

Se ha comprobado que temperaturas superiores a 60°C durante un cierto tiempo producen la muerte de las larvas (Vidaček *et al.*, 2011) por lo que en pescados parasitados sometidos a un proceso de enlatado se produce la muerte de las larvas evitando en el consumidor la infestación y la sensibilización a los alérgenos. Sin embargo, dependiendo del tipo de calentamiento y las condiciones utilizadas, puede haber una liberación adicional de alérgenos al músculo de pescado debido principalmente a los cambios de permeabilidad o daño en la cutícula por el tratamiento aplicado (Vidaček *et al.*, 2009b; 2011).

Aunque se ha demostrado que algunos de los alérgenos de *A. simplex* (Ani s 4, entre otros) son muy estables a altas temperaturas ($\geq 100^\circ\text{C}$, 30 min) y altas presiones (≥ 200 MPa, 15 min) (Vidaček *et al.*, 2009b; 2009c; 2010; 2011; Brutti *et al.*, 2010), aún no hay información disponible sobre los efectos que causan en los alérgenos de *A. simplex* los tratamientos térmicos dados en condiciones de esterilización del pescado conservado enlatado.

5.1.1 Objetivo

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del proceso de esterilización en alérgenos de *Anisakis* teniendo en cuenta distintas condiciones de procesado, líquidos de gobierno y tratamientos térmicos.

5.1.2 Diseño del experimento

Se utilizaron sistemas modelo de esterilización de conservas de pescado y los tratamientos fueron aplicados en larvas de *Anisakis* y músculo infestado artificialmente.

En las Figuras 5.1 y 5.2 se presentan de forma esquemática el procedimiento seguido en larvas de *Anisakis* y músculo infestado artificialmente, mientras que en la Figura 5.3 se presentan algunas imágenes del proceso seguido.

5.1.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Larvas de *Anisakis* spp.

Las larvas vivas de *Anisakis* (L3) fueron obtenidas de ovarios y vísceras de merluzas (*Merluccius merluccius*) muy parasitadas, procedentes de diferentes caladeros del Atlántico Noroccidental (Zona de pesca FAO 27) y recepcionadas en Mercamadrid. Para el experimento se utilizó un lote de aproximadamente 100 g de larvas incluyendo tejidos de vísceras y ovarios que fueron almacenadas a $5\pm1^{\circ}\text{C}$ desde su recepción en el ICTAN hasta su posterior uso.

La identificación taxonómica se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

Pescado utilizado

Se utilizaron piezas de lomos comerciales empacados a vacío y descongelados de atún de las especies patudo (*Thunnus obesus*) ($\geq 2,3$ kg) (lote 1) y rabil (*Thunnus albacares*) ($\geq 3,5$ kg) (lotes 2 y 3), procedentes de la Zona de pesca FAO 77 (Océano Pacífico), recepcionadas en Mercamadrid en diferentes épocas del año. Las piezas refrigeradas fueron transportadas a los laboratorios del ICTAN, donde fueron cortadas en rodajas de 2 cm de espesor y sometidas al tratamiento correspondiente. Durante la recepción de las muestras se siguió el Protocolo descrito en el Apartado 3.1.

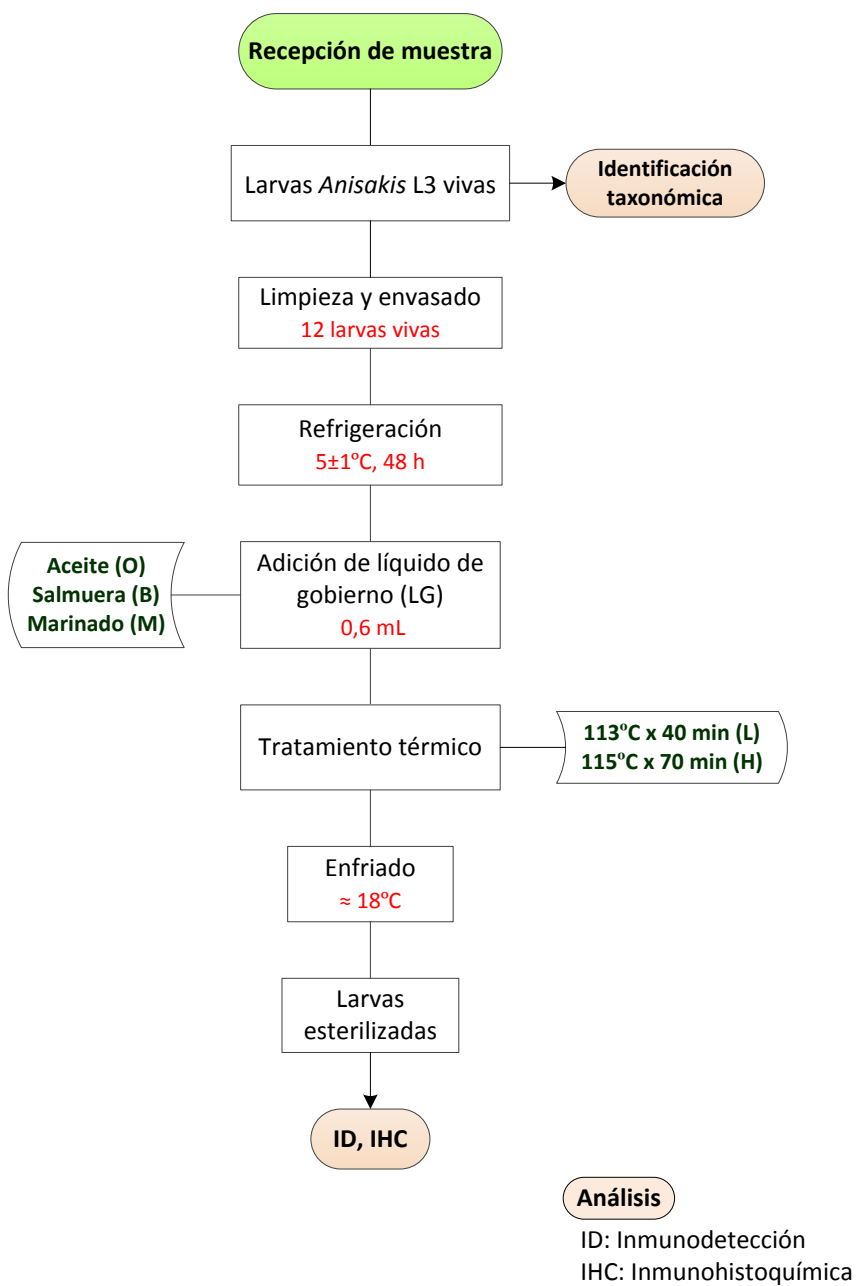
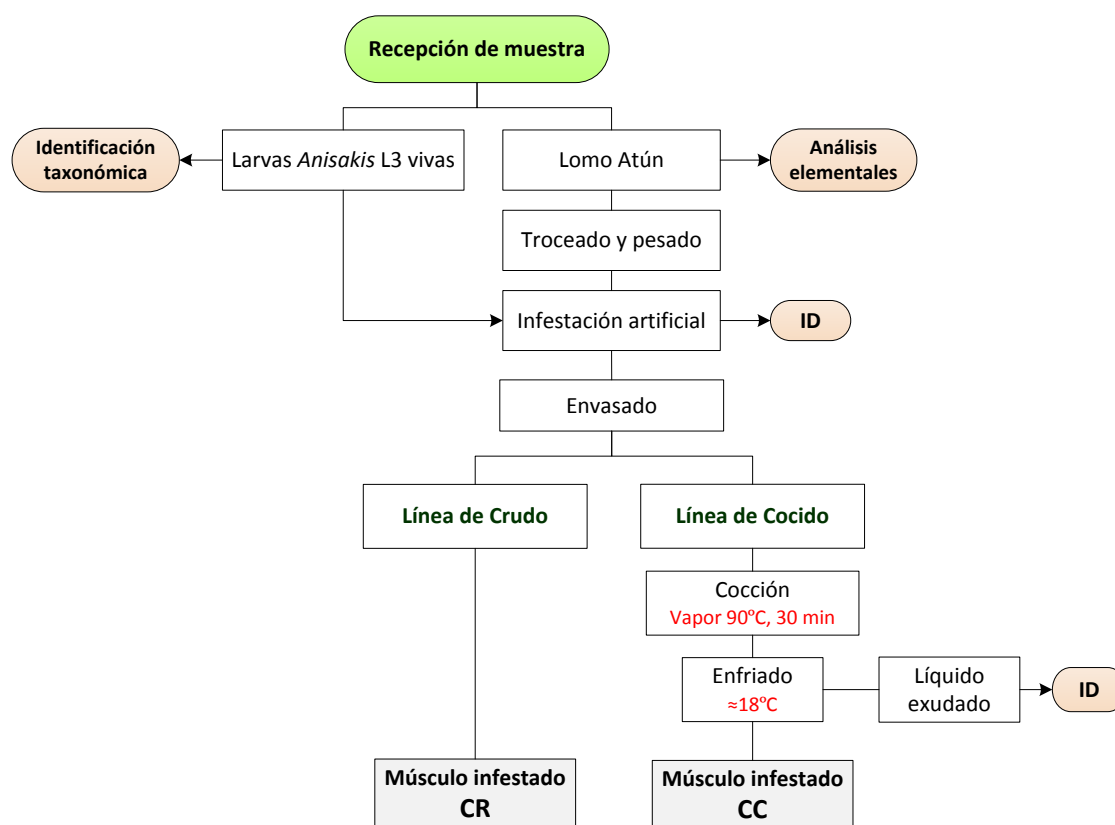


Figura 5.1 Esquema general del sistema modelo de tratamiento térmico de esterilización en larvas de *Anisakis*.



Tratamiento térmico

Para las líneas CR y CC

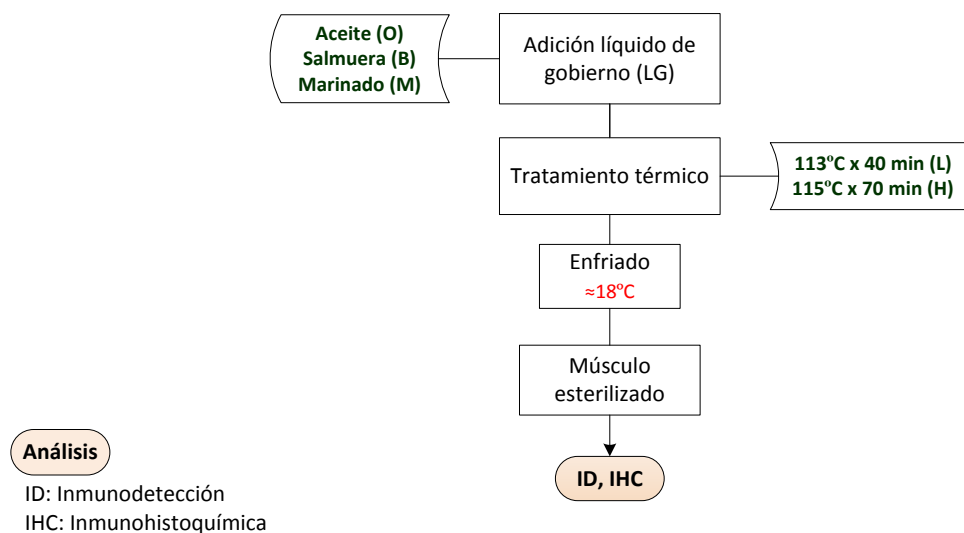
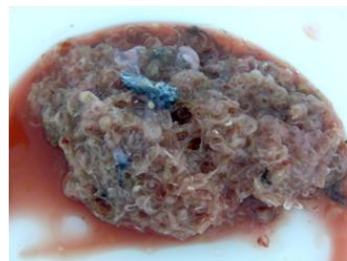
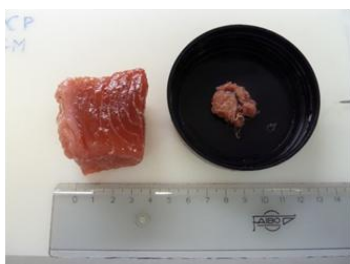


Figura 5.2 Esquema general del sistema modelo de tratamiento térmico de esterilización en músculo de atún con infestación artificial.

Recepción de muestras



Infestación artificial

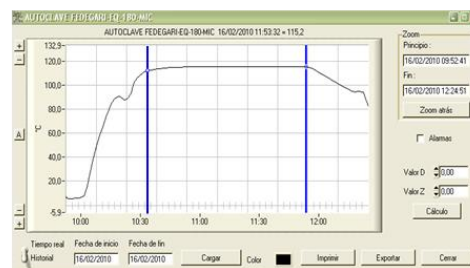


Línea de Cocido (CC)



Línea de Crudo (CR)

Tratamiento térmico



Músculo esterilizado



Líquidos de gobierno

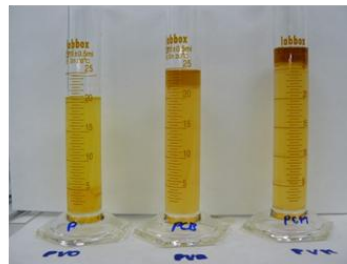


Figura 5.3 Imágenes del proceso de tratamiento térmico de esterilización de conservas de músculo de atún.

Preparación de la muestra

Se obtuvieron 3 lotes dependiendo de la muestra utilizada y fecha de recepción. La descripción de los lotes y tratamientos aplicados a las larvas L3 de *Anisakis* spp. y al músculo de atún infestado se resumen en la Tabla 5.1 y se describen posteriormente.

Tabla 5.1 Descripción de los lotes y tratamientos aplicados a larvas L3 de *Anisakis* y músculo de atún infestado artificialmente.

Tratamiento		Lote 1	Lote 2	Lote 3
Fecha		Febrero 2010	Abril 2010	Noviembre 2011
Muestras			Larvas L3 <i>Anisakis</i>	Larvas L3 <i>Anisakis</i>
		<i>Thunnus obesus</i>	<i>Thunnus albacares</i>	<i>Thunnus albacares</i>
Tasa de infestación (nº larvas/100 g músculo)		10	12	12
Líneas de proceso*	CR	✓	✓	✓
	CC	✓		
Líquidos de gobierno	O		✓	✓
	B	✓	✓	✓
	M		✓	✓
Tratamientos térmicos	L	✓	✓	
	H		✓	✓
Análisis	Larvas		IHC, WB	DB
	ME	IHC	IHC, WB, DB	
	ME+LG			DB

*Aplicado sólo a músculo

CR: Línea de crudo; **CC:** Línea de cocido; **O:** Aceite; **B:** Salmuera; **M:** Marinado; **L:** Tratamiento térmico de 113°C, 40 min; **H:** Tratamiento térmico de 115°C, 70 min; **ME:** Músculo esterilizado; **LG:** Líquido de gobierno; **IHC:** Inmunohistoquímica; **WB:** Western blot; **DB:** Dot blot.

Para los experimentos con *Anisakis*, las larvas fueron separadas cuidadosamente del tejido (ovarios y/o vísceras) con pinzas y sometidas a lavados sucesivos con agua destilada. Una vez limpias fueron contabilizadas y colocadas en tubos Pyrex de 10 mL de capacidad, luego se almacenaron en refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 48 horas hasta su posterior tratamiento.

Para los experimentos con músculo, las rodajas de atún fueron artificialmente infestadas con larvas vivas de *Anisakis* (L3). Las larvas se colocaron entre dos capas de músculo (tipo sándwich) en una proporción de 10 larvas por cada 100 g de músculo para el lote 1 y 12 larvas por cada 100 g de músculo para los lotes 2 y 3. Las muestras infestadas fueron colocadas en frascos de Pyrex de 100 mL de capacidad y se almacenaron en condiciones de refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 48 horas para favorecer la penetración de las larvas en el músculo (Tejada *et al.*, 2006a; 2006b).

En la selección de los parámetros a utilizar en cada tratamiento, se tomaron como referencia las condiciones utilizadas en las líneas comerciales de producción de conservas y las recomendadas por la Norma Codex Stan 70 (FAO/OMS, 1981) y la Norma Técnica Peruana (NTP 204.001:1980; NTP 204.002:1981).

i. Líneas de proceso

- **Línea de crudo (CR-Canned raw).** La cocción del músculo infestado se llevó a cabo en el interior del envase durante el proceso de esterilización. Este proceso se aplicó en músculo de atún infestado de los lotes 1, 2 y 3.
- **Línea de cocido (CC-Canned cook).** El músculo infestado dentro del frasco de Pyrex fue sometido a cocción con vapor (Rational Combi-Master CM6, Alemania) a 90°C durante 30 minutos. Se separó el líquido de cocción para su posterior estudio. Este proceso sólo se aplicó en músculo de atún infestado del lote 1.

ii. Líquidos de gobierno o cobertura (LG)

Para todas las muestras de *Anisakis* de los lotes 2 y 3 la cantidad de líquido de gobierno utilizado se calculó teniendo en cuenta la dilución debido al contenido de agua del músculo; el volumen para 12 larvas fue de 0,6 mL. En el caso de las muestras de músculo infestadas, se adicionaron 15 mL de líquido de gobierno. Los líquidos de gobierno utilizados fueron los siguientes:

- ***Aceite (O-Oil)*** (6 g de NaCl en 100 mL de aceite de oliva).
- ***Salmuera (B-Brine)*** (6 g de NaCl en 100 mL de agua).
- ***Marinado (M-Marinated)*** (6 g de NaCl, 50 mL de vinagre de vino y 50 mL de agua).

Durante la adición del líquido de gobierno en las muestras de músculo, se tuvo en cuenta reservar un espacio entre 3-7 mm en la parte superior del envase, de tal forma que el producto entre músculo y líquido de gobierno ocupe el 90% de espacio en el envase.

iii. Tratamientos térmicos

Los tratamientos térmicos se aplicaron en todos los lotes de las muestras de larvas de *Anisakis* y músculo. La operación de esterilización se efectuó en autoclave (Fedegari FVG3, EQ-180 MC, Fedegari Autoclavi Spa, Italy) tomando en cuenta las siguientes condiciones de temperatura y tiempo.

- ***Temperatura y tiempo mínimo de autoclave (L-Low)***: 113°C durante 40 minutos de proceso de esterilización y 60 minutos de proceso total. Estas condiciones sólo se aplicaron en las muestras de los lotes 1 y 2.

- **Temperatura y tiempo máximo de autoclave (H-High):** 115°C durante 70 minutos de proceso de esterilización y 90 minutos de proceso total. Estas condiciones se aplicaron en las muestras de los lotes 2 y 3.

Terminados los tratamientos térmicos, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente. En las muestras de *Anisakis* se mantuvo el líquido de gobierno, mientras que en el músculo cocido de los lotes 1 y 2 se retiró el líquido de gobierno para su estudio por separado. En el caso del lote 3, se obtuvo una mezcla homogénea del músculo con el líquido de gobierno, que posteriormente fue analizada.

5.1.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

Identificación taxonómica de larvas

Según protocolo descrito en el Apartado 3.2.1.

Análisis elementales y pH

Se realizaron los análisis elementales y pH del músculo inicial utilizado en cada lote (Apartado 3.2.2).

Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

La inmunodetección para el lote 2 se realizó por Western blot (WB) y por Dot blot (DB) para el lote 3 (Apartado 3.2.6.2), mientras que la detección de las proteínas alergénicas por inmunohistoquímica (IHC) (Apartado 3.2.6.3) se aplicó a las muestras correspondientes a los lotes 1 y 2.

5.1.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado se describe en el Apartado 3.3. Para inmunohistoquímica, el área estándar (Sa) utilizada en las micrografías del lote 1 fue 1,65083948 μm^2 y para las del lote 2 fue 1,16839928 μm^2 .

5.1.3 Resultados y Discusión

5.1.3.1 Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

Morfológicamente todas las larvas fueron clasificadas como Tipo I . Las larvas del lote 2 se identificaron como *Anisakis simplex* s.s. mientras que las del lote 3 como *Anisakis simplex* s.s. (97.15 %) e híbridos de *Anisakis simplex* s.s. y *A. pegreffii* (2.85%).

5.1.3.2 Análisis elementales y pH del músculo inicial

Los resultados de los análisis elementales del músculo de atún se presentan en la Tabla 5.2 y se encuentran dentro de los valores reportados para esa especie (Ruiz-Capillas y Moral, 2005; USDA, 2011). Dependiendo del lote el pH inicial del atún osciló entre 6,11 y 6,21.

Tabla 5.2 Análisis elementales y pH de músculo de atún.

Lote	Humedad g kg ⁻¹	Proteína g kg ⁻¹	Cenizas g kg ⁻¹	Grasa g kg ⁻¹	pH
1	709,70 ± 3,22	231,67 ± 1,94	26,37 ± 1,06	66,55 ± 4,37	6,11 ± 0,01
2	735,16 ± 1,38	257,77 ± 5,16	20,65 ± 3,13	22,86 ± 0,20	6,11 ± 0,04
3	749,21 ± 2,66	210,80 ± 11,48	17,56 ± 0,59	26,63 ± 10,08	6,21 ± 0,04

5.1.3.3 Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

Los tratamientos aplicados al lote 1 fueron seleccionados con la finalidad de evaluar el comportamiento de los alérgenos en dos líneas de proceso, línea de crudo (CR) y línea de cocido (CC), utilizando como líquido de gobierno salmuera (B) y aplicando un tratamiento térmico de 113°C durante 40 minutos (L).

En un inicio se planteó estudiar por WB el líquido de exudado procedente de la cocción previa del músculo (CC) y los correspondientes líquidos de gobierno; sin

embargo, la presencia de grasa y partículas de músculo no permitieron obtener extractos lo suficientemente claros y homogéneos impidiendo la inmunodetección. No obstante no se descarta la posibilidad de encontrar proteínas alergénicas en los extractos.

Los resultados obtenidos de lote 1 mostrados en la Tabla 5.3 corresponden a muestras de músculo analizadas por inmunohistoquímica (IHC). De forma general, se puede indicar que el tratamiento térmico aplicado (L) (113°C, 40 min) disminuye la densidad de etiquetado de alérgenos de Ani s 4, no encontrándose diferencias significativas entre las líneas de proceso utilizadas (CR y CC). Por otro lado, aunque se obtuvo una tasa residual por debajo del 22,5%, los alérgenos de Ani s 4 fueron liberados en el músculo y se mantuvieron activos después del tratamiento térmico.

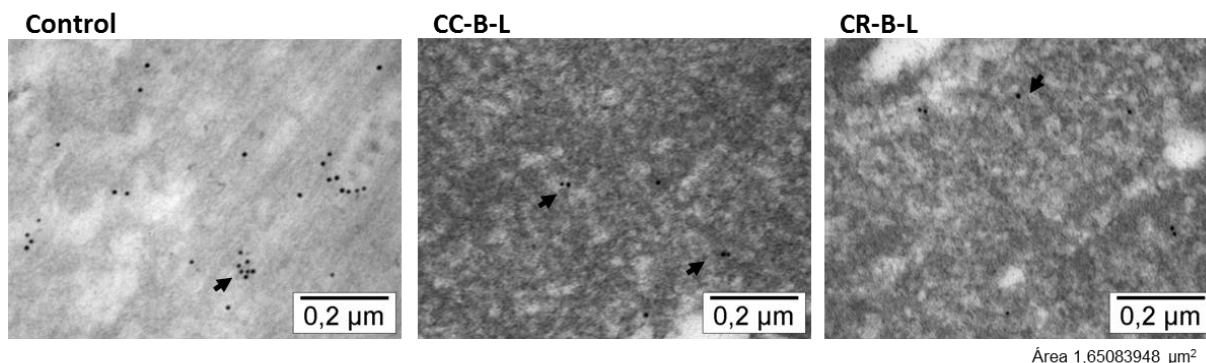
Tabla 5.3 Densidad de etiquetado (Ns) y tasa residual de alérgenos (%) de Ani s 4 en músculo de atún infestado artificialmente (lote 1) sometido a diferentes condiciones de tratamiento térmico.

Músculo infestado					
Lote	Tratamiento			Ns	% Residual
1	Control			28,59 ± 1,63 ^a	
	CR	B	L	6,42 ± 0,52 ^b	22,46
	CC	B	L	5,55 ± 0,54 ^b	19,41

Lote 1: *Thunnus obesus*, infestado con 10 larvas/100 g músculo; **Control:** Músculo infestado sin tratamiento térmico; **Líneas de proceso:** CR Línea de crudo; CC Línea de cocido; **Líquido de gobierno:** B Salmuera; **Tratamientos térmicos:** L 113°C, 40 min. Letras diferentes (a, b, c...) en la misma columna significan diferencias respecto al control correspondiente y entre tratamientos ($p < 0,05$); $n = 50$.

En la Figura 5.4 se presentan algunos ejemplos de la inmunolocalización (IHC) realizada en músculo de los lotes 1 y 2. Los resultados obtenidos del lote 1 sirvieron de base para seleccionar los tratamientos posteriores.

Lote 1



Lote 2

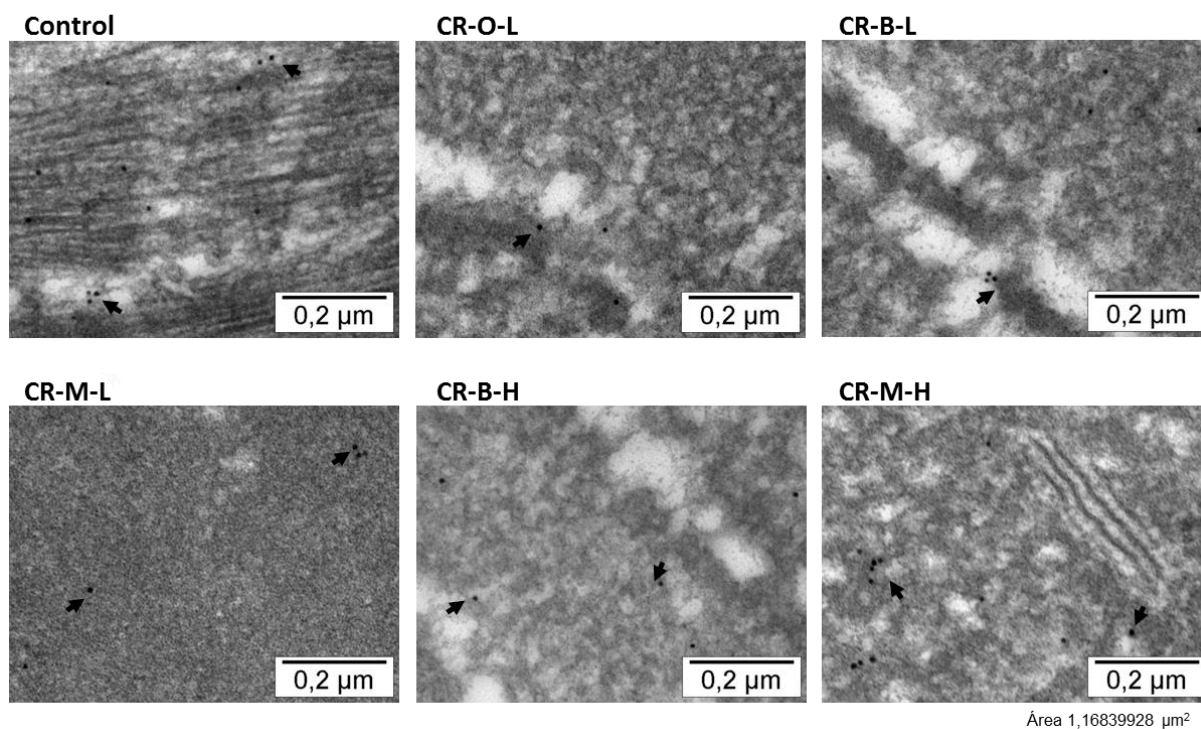


Figura 5.4. Inmunolocalización (IHC) de antígenos de *Anisakis* 4 en músculo de atún con infestación artificial sometido a diferentes condiciones de tratamiento térmico. **Lote 1:** *Thunnus obesus*, infestado con 10 larvas/100 g músculo; **Lote 2:** *Thunnus albacares*, infestado con 12 larvas/100 g músculo; **Control:** Músculo infestado sin tratamiento; **Líneas de proceso:** **CR** Línea de crudo; **CC** Línea de cocido; **Líquidos de gobierno:** **O** Aceite; **B** Salmuera; **M** Marinado; **Tratamientos térmicos:** **L** 113°C, 40 min; **H** 115°C, 70 min. Las partículas de 10 nm de oro conjugado con el anticuerpo secundario aparecen en la micrografía como círculos oscuros, como los indicados por flechas.

En el caso de las muestras del lote 2 el objetivo fue evaluar el comportamiento de los alérgenos frente a diferentes condiciones de tratamiento térmico (L y H). Se utilizó la línea de crudo (CR) y tres tipos de líquidos de gobierno (O, B y M) y los tratamientos fueron aplicados a larvas L3 de *Anisakis* y músculo infestado artificialmente con 12 larvas por cada 100 g de músculo. Las muestras fueron evaluadas por inmunohistoquímica (IHC), Western blot (WB) y cuantificadas por Dot blot (DB) y en el caso de las muestras de músculo, la extracción de las proteínas alergénicas para la inmunodetección por WB y DB se realizó en músculo sin incluir el líquido de gobierno.

Los resultados de IHC de las muestras (larvas y músculo) del lote 2 se presentan en la Tabla 5.4, mientras que en la Figura 5.4 se observan algunos ejemplos de la inmunolocalización (IHC) realizada en músculo. Por problemas en la etapa de fijación, las muestras de *Anisakis* y músculo correspondientes al tratamiento CR-H en aceite (O), no pudieron ser analizadas por inmunohistoquímica (IHC).

En las muestras de larvas con tratamiento L se obtuvieron tasas residuales de *Anisakis* de hasta un 90% dependiendo del líquido de gobierno utilizado. No se encontraron diferencias significativas entre las muestras de larvas con líquidos de gobierno O y B, pero sí respecto a M que presentó un descenso en la detección de *Anisakis* (Tabla 5.4).

Las muestras de músculo con tratamiento térmico L tuvieron una tendencia similar a la descrita en las larvas aunque la detección fue inferior ($\leq 30\%$) y sólo se encontró un descenso significativo en la muestra M, que presentó una menor tasa residual de *Anisakis* (18,14%).

Al comparar las muestras de músculo de la línea CR en salmuera (B) de los lotes 1 y 2 tratados en condiciones de tratamiento térmico L, se observó que ambos lotes presentaron el mismo comportamiento relativo a pesar de tener una tasa de infestación y una respuesta alergénica del lote control diferente.

Tabla 5.4 Densidad de etiquetado (Ns) y tasa residual de alérgenos (%) de Anis s 4 en larvas L3 de *Anisakis simplex* s.s. y músculo de atún infestado artificialmente (lote 2) sometidos a diferentes condiciones de tratamiento térmico.

<i>Anisakis simplex</i> s.s.				
Lote	Tratamiento		Ns	% Residual
2	O	Control	6,44 ± 0,82 ^a	
		L	5,56 ± 0,78 ^{a,b}	86,37
		H	S/D	S/D
	B	L	5,82 ± 1,01 ^{a,b}	90,35
		H	10,10 ± 1,07 ^c	156,79
	M	L	4,28 ± 0,94 ^{b,d}	66,43
		H	8,13 ± 1,10 ^{c,e}	126,23
	Músculo infestado			
Lote	Tratamiento		Ns	% Residual
2	O	Control	18,02 ± 1,49 ^a	
		L	5,34 ± 0,54 ^b	29,63
		H	S/D	S/D
	CR	L	5,10 ± 0,50 ^b	28,30
		H	8,23 ± 1,07 ^c	45,68
	M	L	3,27 ± 0,38 ^d	18,14
		H	10,92 ± 0,80 ^e	60,59

Lote 2: Larvas L3 de *Anisakis simplex* s.s. y *Thunnus albacares*, infestado con 12 larvas/100 g músculo; **Control:** Larvas o Músculo infestado sin tratamiento térmico; **Línea de proceso:** CR Línea de crudo; **Líquidos de gobierno:** O Aceite; B Salmuera; M Marinado; **Tratamientos térmicos:** L 113°C, 40 min; H 115°C, 70 min; S/D: Sin determinar. Letras diferentes (a, b, c...) en la misma columna significan diferencias respecto al control correspondiente y entre tratamientos ($p < 0,05$); n=50.

En los tratamientos H tanto en larvas y músculo, se observó un incremento significativo de la tasa residual de Ani s 4 respecto al tratamiento L, obteniéndose mayor variabilidad en las muestras sometidas a tratamiento térmico H. Se observaron diferencias significativas entre los lotes en función del líquido de gobierno utilizado (B y M).

La elevada tasa residual encontrada en las muestras de larvas y músculo nos sugiere que la aplicación de temperaturas altas durante tiempos prolongados puede producir una mayor liberación de alérgenos al medio debido a que la permeabilidad de la cutícula de las larvas se modifica por el calor (Vidaček *et al.*, 2009b; 2010; 2011). En el caso de las muestras de larvas con M se confirma la resistencia de los alérgenos al ácido, inclusive en condiciones de temperatura más severas a las estudiadas previamente (Caballero y Moneo, 2004; Solas *et al.*, 2009; Vidaček *et al.*, 2009b; 2009c; 2011).

Por otro lado, las diferencias encontradas en los valores de Ns entre larvas y músculo pueden atribuirse a diversos factores. Es sabido que algunos de los alérgenos aislados a *A. simplex* son altamente resistentes al calor (Moneo *et al.*, 2000; 2005; Kobayashi *et al.*, 2007; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007); sin embargo, al encontrarse en matrices más complejas y ser sometidos a tratamientos térmicos, las proteínas alergénicas y no alergénicas podrían alterarse e inducir cambios estructurales, modificaciones en los enlaces o causar agregación de proteínas, generando finalmente cambios en la alergenidad (Immer, 2006; Vidaček *et al.*, 2010).

En la inmunodetección por WB (Figura 5.5) se observó que Ani s 4 disminuyó en las muestras con tratamientos en comparación con larvas aisladas o músculo infestado sin tratamiento. En larvas aisladas con tratamiento térmico se encontró una disminución considerable de Ani s 4 durante el calentamiento y prácticamente no se apreciaron bandas en las muestras con tratamiento H. En la muestra con tratamiento L en aceite (O), se observó la mayor concentración de Ani s 4.

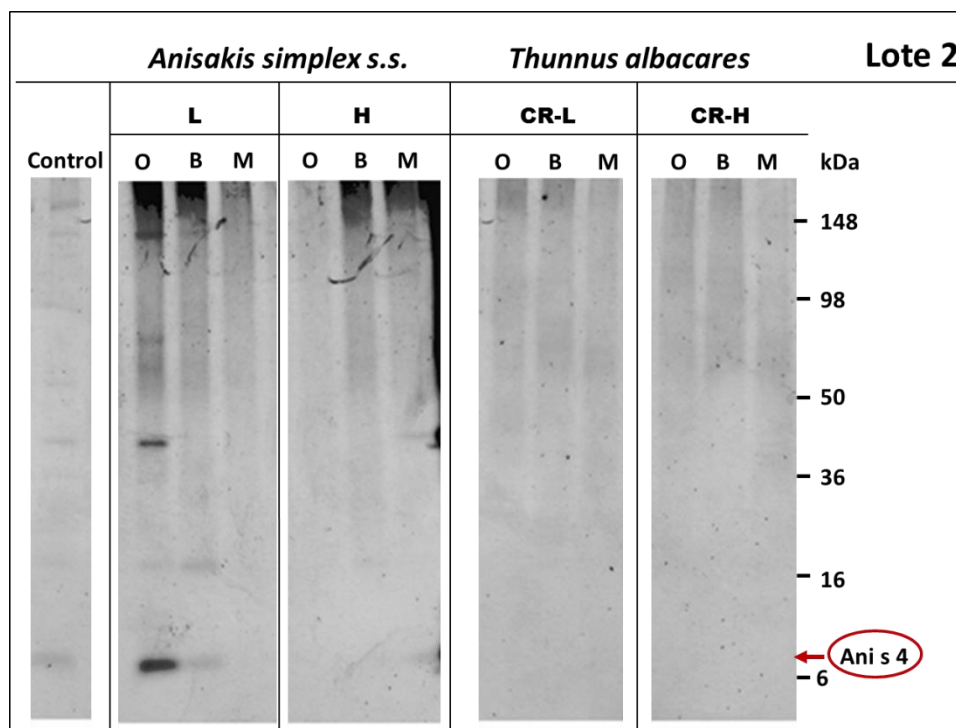


Figura 5.5 Inmunodetección revelada con antígenos de Ani s 4 en larvas de *Anisakis simplex s.s.* y músculo de *Thunnus albacares* infestado con 12 larvas/100 g músculo (lote 2) sometidos a diferentes condiciones de tratamiento térmico de esterilización. **Control:** Músculo infestado sin tratamiento; **Línea de proceso: CR** Línea de crudo; **Líquidos de gobierno: O** Aceite; **B** Salmuera; **M** Marinado; **Tratamientos térmicos: L** 113°C, 40 min; **H** 115°C, 70 min.

En las muestras de músculo, aunque la intensidad fue baja, se logró detectar antígenos de *A. simplex* en la muestra control infestada sin tratamiento térmico (MP), mientras que en las muestras de músculo sometidas a tratamiento térmico las bandas casi no se apreciaron, probablemente debido a la disminución de reconocimiento alergénico después del tratamiento de esterilización que hace que Ani s 4 se encuentre por debajo del rango de detección con la técnica utilizada (≤ 1 ppm).

Los resultados obtenidos por WB no fueron determinantes y aunque nos dieron una idea del comportamiento de los alérgenos frente al tratamiento térmico, para una mejor evaluación fue necesario cuantificar la respuesta alergénica por DB.

En la Figura 5.6 se representan gráficamente los resultados obtenidos por DB para las muestras de músculo de lote 2. En todas las muestras se evidenció una disminución significativa de Ani s 4 respecto a la muestra control sin tratamiento térmico, y a diferencia de lo observado en el estudio por IHC no se encontraron cambios significativos entre las muestras de músculo con tratamientos térmicos L y H. En todos los casos la mayor detección la presentaron las muestras O.

En la detección de Extracto crudo de *A. simplex* se observó una disminución significativa respecto al control sin tratamiento y diferencias significativas entre los tratamientos térmicos L y H, dependiendo el aumento o disminución de la detección del líquido de gobierno utilizado. La mayor detección de Extracto crudo de *A. simplex* la presentó la muestra M sometida a tratamiento térmico H.

Lote 2: *Thunnus albacares*

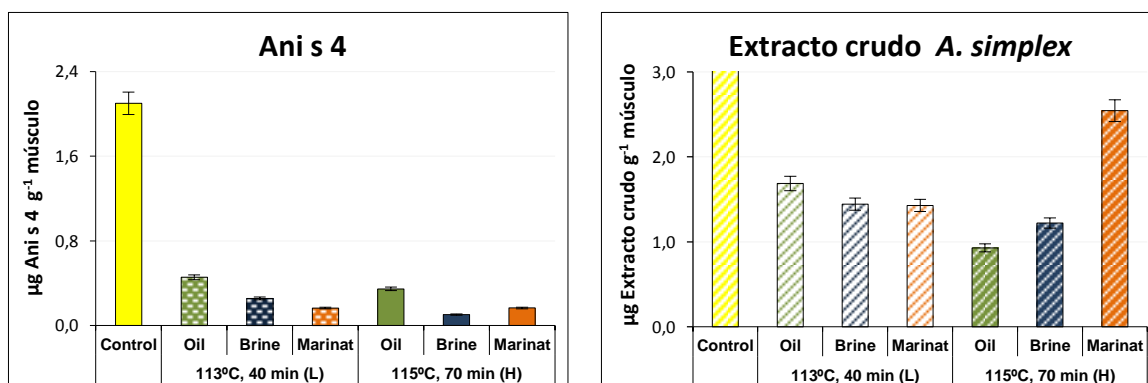


Figura 5.6 Cuantificación por Dot blot (DB) de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de *Thunnus albacares* infestado con 12 larvas/100 g músculo (lote 2) y sometido a diferentes condiciones de tratamiento térmico. Análisis efectuado con músculo sin incluir el líquido de gobierno. **Control:** Músculo infestado sin tratamiento; **Línea de proceso:** CR Línea de crudo; **Líquidos de gobierno:** O Aceite; B Salmuera; M Marinado; **Tratamientos térmicos:** L 113°C, 40 min; H 115°C, 70 min.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el lote 2, las muestras del lote 3 sólo fueron sometidas a tratamiento térmico H manteniendo constante el resto de parámetros.

En la Figura 5.7 se representan las tasas residuales (%) de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* en larvas sometidas a tratamiento térmico H y con diferentes líquidos de gobierno. En todas las muestras de larvas se evidenciaron diferencias significativas en la detección de Anis 4 respecto al control sin tratamiento y entre muestras en función al líquido de gobierno utilizado (O, B y M) y la menor detección se observó en las larvas envasadas con M. Como se observó en las larvas del lote 2 sometidas a condiciones similares de tratamiento, las larvas de este lote presentaron tasas residuales de Anis 4 superiores al 100%. En el caso de Extracto crudo de *A. simplex* las tasas residuales en las muestras de larvas no superaron el 37% y la mayor detección la obtuvo la muestra de larvas envasada con líquido de gobierno O.

Lote 3: *Anisakis simplex* spp.

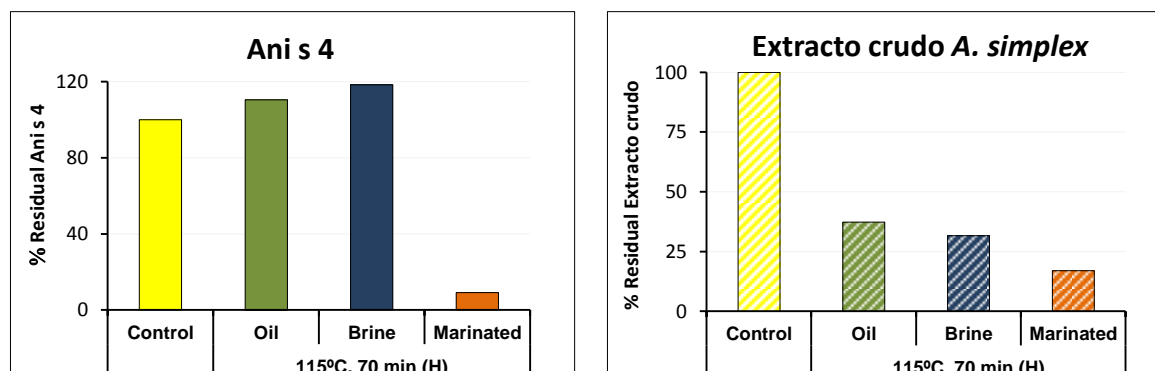


Figura 5.7 Tasa residual de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* en larvas de *A. simplex* spp. (lote 3) sometidas a tratamiento térmico de 115°C durante 70 minutos (H). **Control:** Músculo infestado sin tratamiento; **Línea de proceso:** CR Línea de crudo; **Líquidos de gobierno:** O Aceite; B Salmuera; M Marinado.

En la Figura 5.8 se presenta la cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* detectada en músculo de atún del lote 3 sometido a tratamiento térmico de esterilización H (115°C, 70 minutos). Debido a que en estudios previos se tuvieron problemas con la inmunodetección por WB (lote 2) de los líquidos de gobierno, la extracción de las proteínas alergénicas del lote 3 se realizó a partir de una mezcla homogénea de músculo y líquido de gobierno.

Lote 3: *Thunnus albacares*

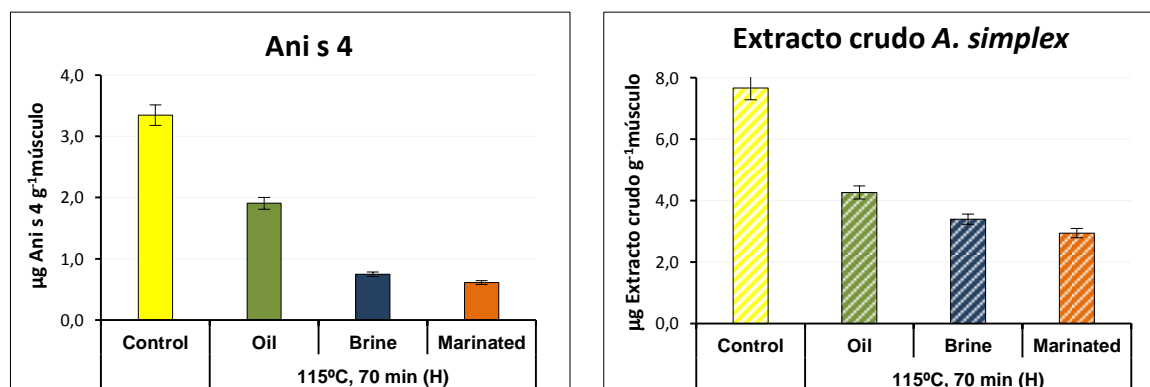


Figura 5.8 Cuantificación por Dot blot (DB) de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en extractos de músculo de *Thunnus albacares* infestado con 12 larvas/100 g músculo (lote 3) y sometido a tratamiento térmico a 115°C durante 70 minutos (H). **Control:** Músculo infestado sin tratamiento; **Línea de proceso: CR** Línea de crudo; **Líquidos de gobierno: O** Aceite; **B** Salmuera; **M** Marinado. Análisis efectuado con la mezcla de músculo y líquido de gobierno.

En todas las muestras de músculo del lote 3 las diferencias fueron significativas respecto a la muestra control sin tratamiento y al líquido de gobierno utilizado (O, B y M). La menor detección de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* se observó en las muestras de músculo M, comportamiento que no coincidió con el observado en las correspondientes M del lote 2. En todos los casos el músculo con líquido de gobierno O obtuvo la mayor detección de alérgenos.

Dependiendo de la respuesta alérgica del lote control y del líquido de gobierno utilizado, se observaron tasas de detección de Anis 4 más altas en las muestras de músculo del lote 3 respecto al lote 2. Esta mayor detección del lote 3 probablemente se deba a que durante el tratamiento térmico parte de las proteínas alérgicas presentes en la matriz del músculo sean liberadas en el exudado de la cocción y retenidas en el líquido de gobierno.

Por otro lado, se presentaron problemas de detección y cuantificación en las muestras en aceite. La presencia de compuestos oleosos no permitió obtener extractos limpios y en muchos casos invalidó la detección. Es necesario purificar la muestra previamente o en su defecto modificar la técnica de extracción para este tipo de productos.

Existen diferencias de resultados entre las técnicas utilizadas. La técnica de inmunohistoquímica (IHC) es un método de detección de alérgenos *in situ* muy sensible, especialmente válido cuando la estructura del músculo se encuentra modificada, tal como ocurre durante el calentamiento o congelación prolongada (Vidaček *et al.*, 2011). De acuerdo a los resultados obtenidos por IHC, las muestras del lote 2 sometidas a tratamiento térmico H presentaron una detección de Anis 4 significativamente superior respecto a las muestras con tratamiento térmico L, con la excepción de las muestras O con tratamiento térmico H que no se lograron estudiar. Sin embargo, al analizar estas mismas muestras por DB las diferencias entre los tratamientos térmicos L y H no fueron percibidas, confirmándonos así la alta sensibilidad de la técnica de IHC.

En todas las muestras de músculo en las que se utilizó aceite (O) como líquido de gobierno se observó una mayor detección de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* respecto a las muestras B y M, aunque la mayor o menor detección dependió del tratamiento térmico utilizado. Entre muestras B y M no se encontraron diferencias significativas.

La detección de Extracto crudo de *A. simplex* dependió del lote, líquido de gobierno y tratamiento térmico utilizado. En el caso del lote 2 la mayor detección se observó en la muestra de músculo M sometida tratamiento térmico H, mientras que en lote 3 la presentó la muestra que utilizó O como líquido de gobierno.

La mayor detección Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* en las muestras sometidas a tratamiento térmico del lote 3 respecto a las del lote 2 nos sugiere que la aplicación de calor bajo estas condiciones produce que parte de los alérgenos presentes en el músculo sean liberados con el exudado procedente de la cocción y retenidas en el líquido de gobierno.

En todos los lotes, la presencia de Ani s 4 y otros antígenos de *Anisakis* nos indica que el tratamiento térmico no elimina la proteína alergénica pero si disminuye su capacidad alergénica, y la mayor o menor detección depende de las condiciones de proceso aplicadas.

Los resultados obtenidos nos demuestran que existen antígenos y alérgenos parasitarios resistentes a altas temperaturas y presión equivalentes a las empleadas en el tratamiento térmico utilizados en el proceso de enlatado industrial, por lo que el pescado conservado en tales condiciones podría suponer un riesgo para la salud para aquellos pacientes previamente sensibilizados a alérgenos termoestables de *A. simplex*.

5.2 Estudio comparativo en el tiempo en músculo congelado con infestación natural y artificial

La congelación es uno de los métodos de conservación más utilizados en la industria pesquera. Sin embargo, durante la congelación y el almacenamiento en congelación el músculo de pescado se somete a cambios químicos y estructurales, que se diferencian dependiendo de la especie y las condiciones de almacenamiento (Tejada *et al.*, 1995; Alvarez *et al.*, 1999). En los pescados magros, los cambios se producen en gran parte como resultado de la alteración en las proteínas miofibrilares, que pierden su calidad funcional (Careche y Tejada, 1990; Del Mazo *et al.*, 1999), proceso que se acelera cuando el músculo se somete a un picado previo a la congelación (Torrejón, 1996).

Los cambios a los que las proteínas miofibrilares se someten durante estos procesos de conservación producen la formación de enlaces proteína-proteína, y en consecuencia las proteínas no pueden ser extraídas en soluciones salinas en las condiciones habituales (Tejada *et al.*, 2003b). Las interacciones secundarias han sido identificadas como la principal causa de la baja extractabilidad y reducción de la funcionalidad de las proteínas miofibrilares durante el almacenamiento congelado (Owusu-Ansah y Hultin, 1992). En todos los casos, la proporción de proteína unida por enlaces covalentes disulfuro y no disulfuro también aumenta con el tiempo de almacenamiento (Careche *et al.*, 1998; Del Mazo *et al.*, 1999; Tejada, 2001; Tejada *et al.*, 2003b).

Actualmente, las especies marinas de peces infestados con larvas L3 de *Anisakis* representan un problema para la industria pesquera y la salud pública. Con la finalidad de matar las larvas de *Anisakis* y evitar la infestación de los consumidores, en muchos países para las industrias que comercializan pescado es obligatorio en determinados casos congelar el pescado en las condiciones mencionadas en los Apartados 1.3 y 1.4. Estas condiciones varían en la UE y en USA (Reglamentos 853/2004; 854/2004 y 1276/2011; FDA, 2011).

La mayoría de las larvas se encuentran en la cavidad peritoneal, tal y como se ha mencionado en el Apartado 1.2.2. Sin embargo, pueden pasar varias horas hasta que los peces capturados comercialmente sean congelados y después de la muerte de los peces, las larvas de la cavidad intestinal y el intestino tienden a migrar hacia el músculo (Smith, 1984; Solas *et al.*, 2008). Se ha establecido que los productos excretados y secretados por las larvas migratorias desempeñan un papel importante en la penetración en el tejido (Morris y Sakanari, 1994). En los seres humanos estos productos de excreción/secreción pueden inducir una respuesta inmune (Moneo *et al.*, 2007).

Aunque se produzca la muerte de las larvas por congelación, se ha comprobado que la permeabilidad de la cutícula puede modificarse (Tejada *et al.*, 2006a), permitiendo la liberación al medio de alérgenos cuando las larvas congeladas son sometidas a tratamientos culinarios posteriores. En tal sentido, consumir pescado adecuadamente cocinado o congelado pero contaminado con alérgenos de *Anisakis* representa un riesgo para la salud en algunos pacientes sensibilizados (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; 2010; Solas *et al.*, 2009; Vidaček *et al.*, 2009a).

Los alérgenos al ser proteínas, durante la conservación en congelación pueden sufrir variaciones tales como agregación, polimerización, desdoblamiento o degradación, que pueden afectar su conformación y modificar su acción alérgica (Tejada *et al.*, 2003a; Vidaček *et al.*, 2009a). La respuesta a los tratamientos de conservación aplicados puede variar en función de las características de las proteínas, peso molecular, grupos SH y/o punto isoeléctrico. Además, la matriz de la que se extraen se modifica con el tiempo de conservación en congelación por lo que su extracción para evaluar los alérgenos pudiera verse alterada.

5.2.1 Objetivo

Los objetivos planteados en este estudio fueron:

- Evaluar el efecto de la modificación del músculo durante la conservación en congelación en la extracción de los alérgenos para su inmunodetección.

- Evaluar comparativamente la detección de proteínas alergénicas en músculo de merluza (*Merluccius merluccius*) con infestación natural y artificial, en fresco y sometido a congelación y almacenamiento en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$).

5.2.2 Diseño del experimento

El esquema del experimento se presenta en la Figura 5.9.

5.2.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Larvas de *Anisakis* spp.

Las larvas vivas de *Anisakis* (L3) fueron obtenidas de ovarios y vísceras de merluzas infestadas (*Merluccius merluccius*) capturadas en la zona de Pesca VIIj-FAO 27 y suministradas por el CETPEC. Para el experimento se utilizó un lote de aproximadamente 100 g de larvas incluyendo tejidos de vísceras y ovarios que fueron almacenadas a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso.

La preparación de las larvas y la identificación taxonómica se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

Pescado utilizado

La especie de pescado utilizada para el estudio fue Merluza (*Merluccius merluccius*) y fueron capturadas en la zona de Pesca VIIj-FAO 27, en febrero del 2010, y suministradas por el CETPEC. La longitud y el peso de los pescados fueron $58,4\pm 5,3$ cm y $1,68\pm 0,33$ kg respectivamente. Se utilizaron 5 individuos los cuales fueron descabezados, eviscerados y cortados en filetes. La temperatura durante el transporte, la manipulación y conservación de las muestras fue $\leq 5^{\circ}\text{C}$.

Se siguió el Protocolo de recepción de muestra descrito en el Apartado 3.1

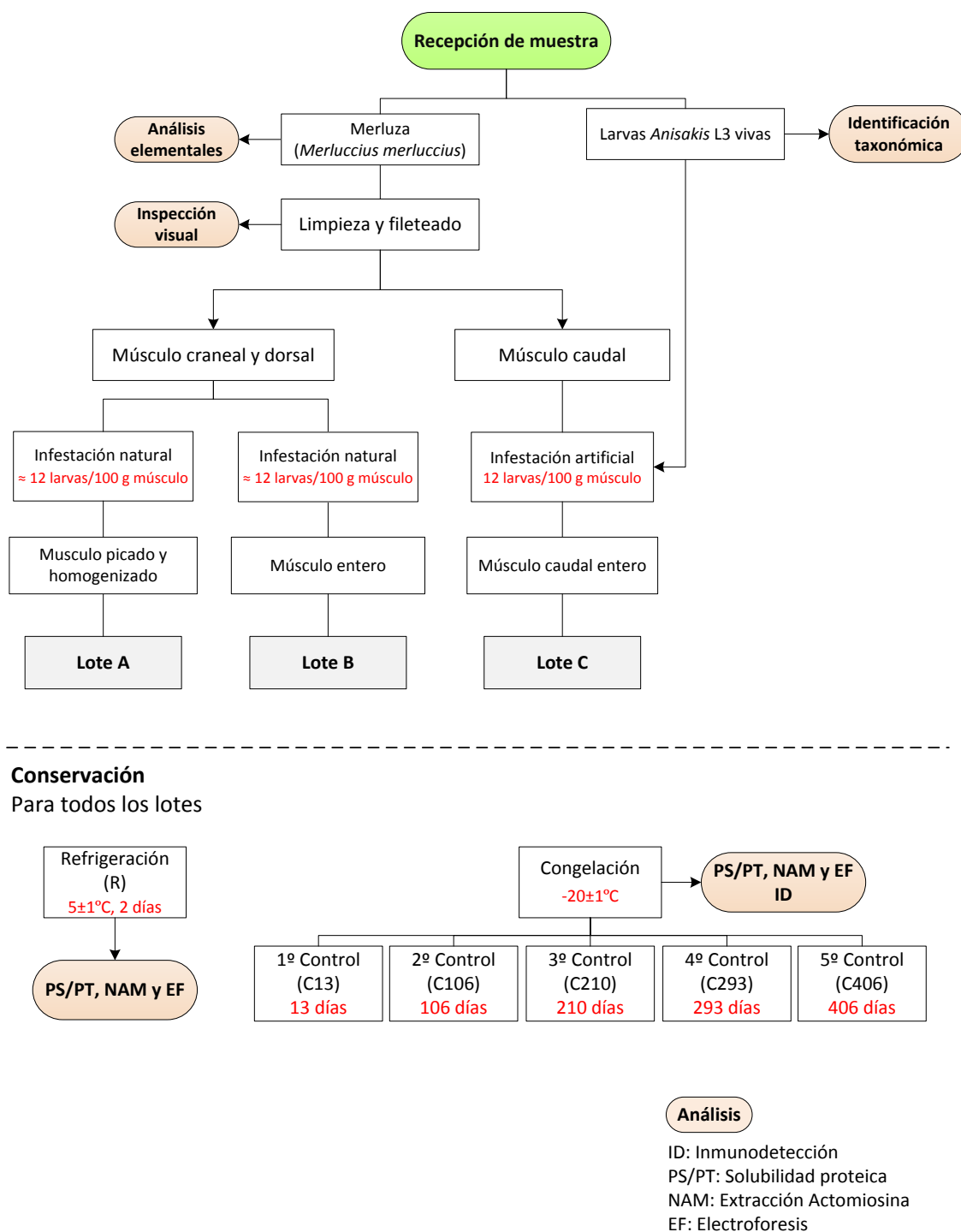


Figura 5.9 Esquema de preparación de muestra para el estudio comparativo en conservación en congelación de músculo de merluza con infestación natural y artificial (12 larvas/100 g músculo).

Preparación de la muestra

Se obtuvieron tres lotes (A, B y C) y dependiendo del nivel de infestación natural se seleccionaron diferentes zonas anatómicas (Figura 5.10). Previamente se realizó una inspección visual de cada pieza con la finalidad de comprobar que la tasa de infestación natural fuera homogénea. Para los lotes A y B se utilizó una mezcla de piezas de la zona craneal y dorsal, mientras que para las muestras con infestación artificial del lote C sólo se incluyó músculo de la zona caudal al considerarla prácticamente libre de infestación natural. A continuación se describe la preparación de cada lote.

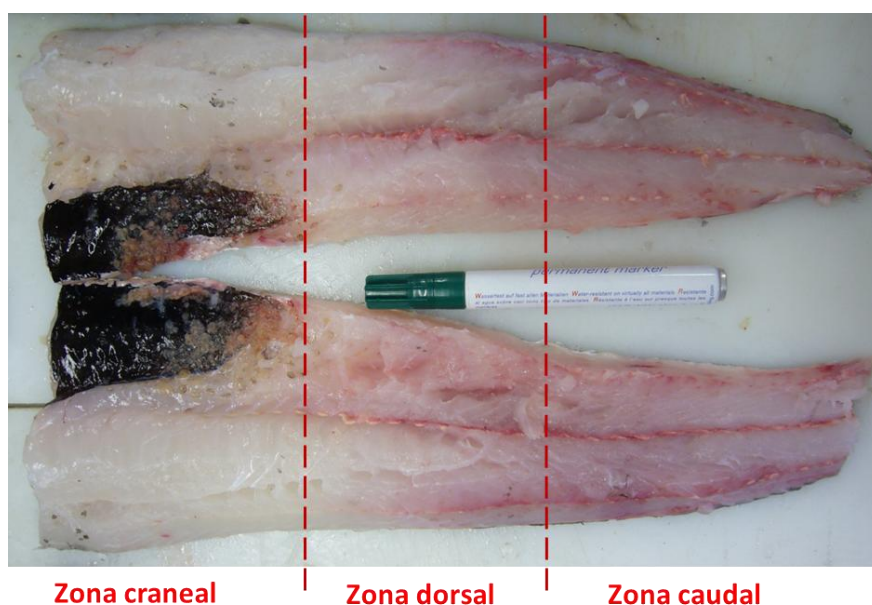


Figura 5.10 Distribución de zonas anatómicas para el estudio comparativo de conservación en congelación de músculo de merluza con infestación natural y artificial (12 larvas/100 g músculo).

- **Lote A: Músculo picado con infestación natural**

Para el lote A se utilizaron 5 piezas de músculo con infestación natural (≈ 12 larvas/100 g músculo) de la zona craneal y dorsal (izquierda y/o derecha). Las piezas fueron troceadas con cuchillo y picadas en una batidora-picadora (Hand

processor accessory, Minipimer 5, Braun GmbH, Alemania) hasta obtener una muestra homogénea, luego se distribuyeron en muestras de 50 g de acuerdo al número de controles a realizar en el tiempo.

- **Lote B: Músculo entero con infestación natural**

Para el lote B también se utilizaron 5 piezas de músculo con infestación natural (≈ 12 larvas/100 g músculo) de la zona craneal y dorsal (izquierda y/o derecha). Las piezas enteras, fueron envasadas en bolsas de polietileno y distribuidas de acuerdo al número de controles a realizar en el tiempo.

Ambos lotes fueron almacenados en refrigeración ($5\pm 1^\circ\text{C}$) durante 2 días con la finalidad de mantener igualdad de condiciones que el lote C.

- **Lote C: Músculo entero con infestación artificial**

Para el lote C se utilizó músculo de la zona caudal prácticamente libre de infestación natural. Las piezas de músculo fueron infestadas artificialmente con larvas vivas de *Anisakis* (L3), extraídas de las vísceras u ovarios de los mismos lotes de pescado. Las larvas se colocaron entre dos capas de músculo (tipo sándwich) en una proporción de 12 larvas por cada 100 g de músculo, y se almacenaron en condiciones de refrigeración ($5\pm 1^\circ\text{C}$) durante un máximo de 48 horas para favorecer la penetración de las larvas en el músculo (Tejada *et al.*, 2006).

Posteriormente, todos los lotes fueron congelados a $-20\pm 2^\circ\text{C}$ para su estudio en el tiempo.

5.2.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

Para los estudios de identificación taxonómica, se siguió el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

Análisis elementales y pH

Se realizaron en cada lote estudiado en refrigeración (R) y a los 406 días de almacenamiento en congelación (C406) (Apartado 3.2.2).

Los análisis que se describen a continuación se realizaron en cada lote estudiado en refrigeración y hasta los 406 días de almacenamiento en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Evaluación y cuantificación de las modificaciones de las proteínas del músculo de pescado

Para evaluar las condiciones iniciales de la proteína, su evolución y modificación durante el tiempo de almacenamiento en congelación, en cada control se determinó y cuantificó el contenido de proteína soluble en soluciones salinas (PS/PT) y de Actomiosina extraída (NAM). Los protocolos utilizados en esta parte del experimento se describen en el Apartado 3.2.3.

Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

La inmunodetección de las proteínas alérgicas se realizó por Western blot (WB) y fueron cuantificadas por Dot blot (DB) (Apartados 3.2.6.2).

Con la finalidad de establecer la cantidad proteína alérgica eliminada durante la técnica de extracción para inmunodetección, se determinó la cantidad de proteína (Apartado 3.2.2.2) en los precipitados obtenidos de la extracción y posteriormente fueron evaluados por inmunohistoquímica (Apartado 3.2.6.3).

5.2.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado en los resultados se describe en el Apartado 3.3. En el caso de las micrografías tomadas para inmunohistoquímica, el área estándar (Sa) utilizada para fue $1,16839928 \mu\text{m}^2$.

5.2.3 Resultados y Discusión

5.2.3.1 Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

Morfológicamente las larvas fueron clasificadas como tipo I e identificadas como *Anisakis simplex* s. s. La zona geográfica de donde fueron extraídas corresponde a la descrita para esta especie (Mattiucci y Nascetti, 2006; Ceballos-Mendiola *et al.* 2010).

5.2.3.2 Análisis elementales y pH del músculo

Los análisis elementales realizados en cada lote estudiado en refrigeración y a los 406 días de conservación en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) se presentan en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5 Análisis elemental y pH en lotes de merluza con infestación natural y artificial (≈ 12 larvas/100 g músculo) estudiados en refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) y a los 406 días de conservación en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$).

Lote		Humedad g kg ⁻¹	Proteína g kg ⁻¹	Cenizas g kg ⁻¹	Grasa g kg ⁻¹	pH
A	R	805,33 \pm 1,48 ^{a/x}	193,43 \pm 1,48 ^{a/x}	12,87 \pm 0,17 ^{a/x}	8,96 \pm 1,95 ^{a/x}	7,12 \pm 0,01 ^{a/x}
	C406	795,53 \pm 1,97 ^{a/y}	195,50 \pm 2,83 ^{a/x}	12,68 \pm 0,18 ^{a/x}	5,93 \pm 0,01 ^{a/y}	7,14 \pm 0,03 ^{a/x}
B	R	811,46 \pm 2,08 ^{b/x}	194,77 \pm 4,19 ^{a/x}	14,03 \pm 2,13 ^{a/x}	8,99 \pm 2,43 ^{a/x}	7,12 \pm 0,01 ^{a/x}
	C406	792,55 \pm 1,49 ^{a/y}	197,57 \pm 1,26 ^{a/x}	13,39 \pm 0,56 ^{a/x}	5,55 \pm 0,51 ^{a/y}	7,17 \pm 0,04 ^{a/x}
C	R	804,80 \pm 1,38 ^{a/x}	198,07 \pm 1,79 ^{a/x}	13,04 \pm 0,17 ^{a/x}	10,66 \pm 2,59 ^{a/x}	7,11 \pm 0,01 ^{a/x}
	C406	765,63 \pm 3,67 ^{b/y}	196,60 \pm 2,71 ^{a/x}	12,41 \pm 0,47 ^{a/x}	19,90 \pm 2,17 ^{b/y}	7,13 \pm 0,01 ^{a/x}

Lote A: Músculo picado con infestación natural; **Lote B:** Músculo entero con infestación natural; **Lote C:** Músculo entero con infestación artificial (12 larvas/100 g músculo). **R:** Refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$); **C406:** Conservación en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 406 días. Letras diferentes (a, b) en la misma columna significan diferencias entre lotes conservados en refrigeración o congelación ($p<0,05$). Letras (x, y) en la misma columna significan diferencias respecto al tiempo de conservación en el mismo lote ($p<0,05$).

En refrigeración (R) sólo se observaron diferencias significativas en el contenido de humedad en el lote B respecto a los lotes A y C, mientras que el resto de componentes (proteína, cenizas y grasa) no presentaron cambios significativos.

En los análisis efectuados a los 406 días de conservación en congelación (C406), el lote C evidenció un descenso significativo en el contenido de humedad respecto a los otros lotes, mientras que el resto de componentes se mantuvo sin cambios significativos, con excepción del contenido de grasa que dependiendo de la pieza analizada y tiempo de conservación presentó variaciones significativas. En el estudio de los lotes B y C se utilizaron piezas enteras de músculo y aunque se procuró realizar un muestreo estándar, fue imposible evitar la variación en composición entre las piezas evaluadas (diferentes zonas anatómicas), independientemente del tiempo de conservación.

Dentro de un mismo lote se observó un descenso en el contenido de humedad entre las muestras R y C406, probablemente debido a la deshidratación del músculo por efecto de la congelación prolongada.

El pH inicial de merluza fue de $7,12 \pm 0,01$ y no se observaron cambios significativos durante el tiempo de conservación en congelación ni entre lotes.

5.2.3.3 Evaluación y cuantificación de las modificaciones de las proteínas del músculo de pescado

Se evaluó el estado inicial de las proteínas a través de la determinación de proteína soluble en soluciones salinas (PS/PT) (Apartado 3.2.3.1) y cantidad de actomiosina extraída (NAM) (Apartado 3.2.3.2). Los cambios de la proteína extraída de músculo de merluza infestada se representan en la Figura 5.11.

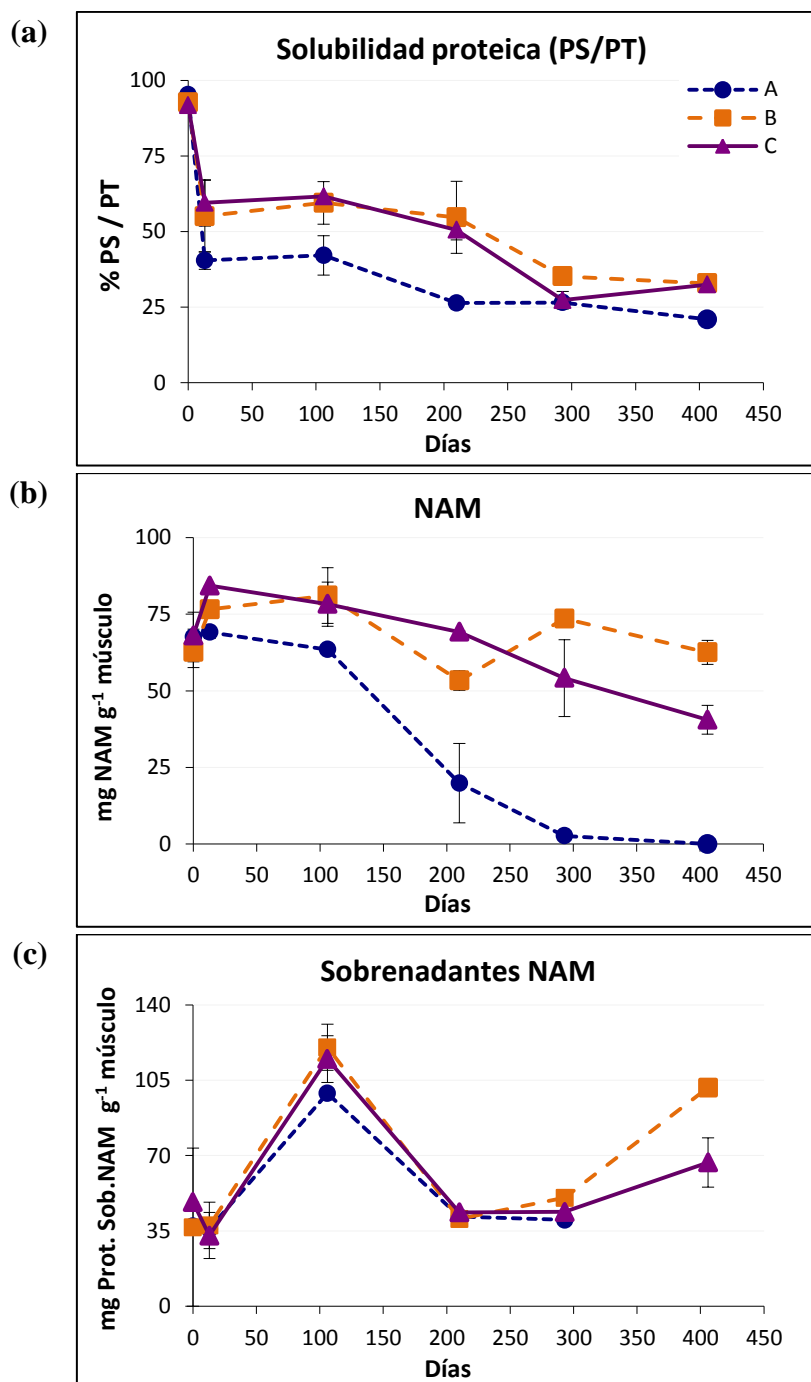


Figura 5.11 Evolución en el tiempo de la solubilidad proteica (% PS/PT) y extractabilidad de actomiosina natural (NAM) (mg g^{-1} músculo) y sobrenadantes de la extracción de NAM ($\text{mg proteína sob. NAM g}^{-1}$ músculo) durante la conservación en refrigeración ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 0 días) y congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$, hasta 406 días) en lotes de merluza con infestación natural y artificial. **Lote A:** Músculo picado con infestación natural; **Lote B:** Músculo entero con infestación natural; **Lote C:** Músculo entero con infestación artificial (≈ 12 larvas/100 g músculo).

En todos los lotes la solubilidad proteica (%PS/PT) presentó un descenso significativo a lo largo del tiempo de conservación en congelación, que se detectó antes en el lote A (músculo picado) y que a partir de los 210 días de congelación en los lotes B y C se produjo un descenso brusco casi al nivel de lote A (Figura 5.11-a).

Diversos autores describen valores de proteína soluble frente a proteína total (PS/PT) superiores en filetes de merluza que en músculo picado conservados a -20°C , encontrando diferencias que oscilan entre el 10% y 20%, resultados similares a los observados en nuestro estudio (Tejada *et al.*, 1984, Careche y Tejada, 1990; Torrejón, 1996).

Entre los lotes B y C, no se observaron diferencias sostenidas en la PS/PT a lo largo del tiempo a pesar de provenir de diferentes zonas anatómicas (dorsal y caudal) y tipo de infestación (natural y artificial).

En los resultados referidos a NAM (Figura 5.11-b) se evidenció una disminución gradual en la cantidad de NAM extraída en los primeros controles, sin embargo, es a partir de los 210 días en congelación cuando se observa una disminución brusca de la proteína, alcanzando valores de $2,66 \pm 0,13 \text{ mg g}^{-1}$ en el lote A. Este comportamiento se asocia con la formación de agregados proteicos durante la conservación en congelación, debido a la formación de interacciones hidrofóbicas y enlaces covalentes (Careche *et al.*, 1999; Del Mazo *et al.*, 1999; Torrejón *et al.*, 1999; Tejada *et al.*, 2003a; 2003b).

La cantidad de NAM extraída al inicio de la conservación en congelación (C13) incrementó ligeramente en los lotes B y C, mientras que en el lote A no varió respecto al obtenido en refrigeración (R). El incremento de NAM en las primeras etapas de congelación ha sido previamente descrito para esta especie (Tejada *et al.*, 2003a; 2003b). En el lote A (músculo picado) no se extrajo NAM a partir de los 293 días de congelación lo que significó que la NAM se encontraba completamente agregada, mientras que la cantidad de proteína obtenida en los sobrenadantes de la extracción NAM sólo se utilizó para el estudio electroforético correspondiente.

La cantidad de proteína de los sobrenadantes obtenidos en la extracción de NAM (Figura 5.11-c) presentó variaciones con el tiempo de conservación y en todos los lotes se observó un incremento en la proteína extraída a los 106 días de congelación (C106) y las diferencias entre el lote A respecto a los lotes B y C fueron significativas. Hasta los 293 días de congelación, entre los lotes B y C no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de proteína extraída en los sobrenadantes y sólo en el control C406 se observó un aumento significativo en el lote B respecto al lote C, probablemente debido a que se utilizaron piezas enteras con diferentes tipos de infestación (natural y artificial).

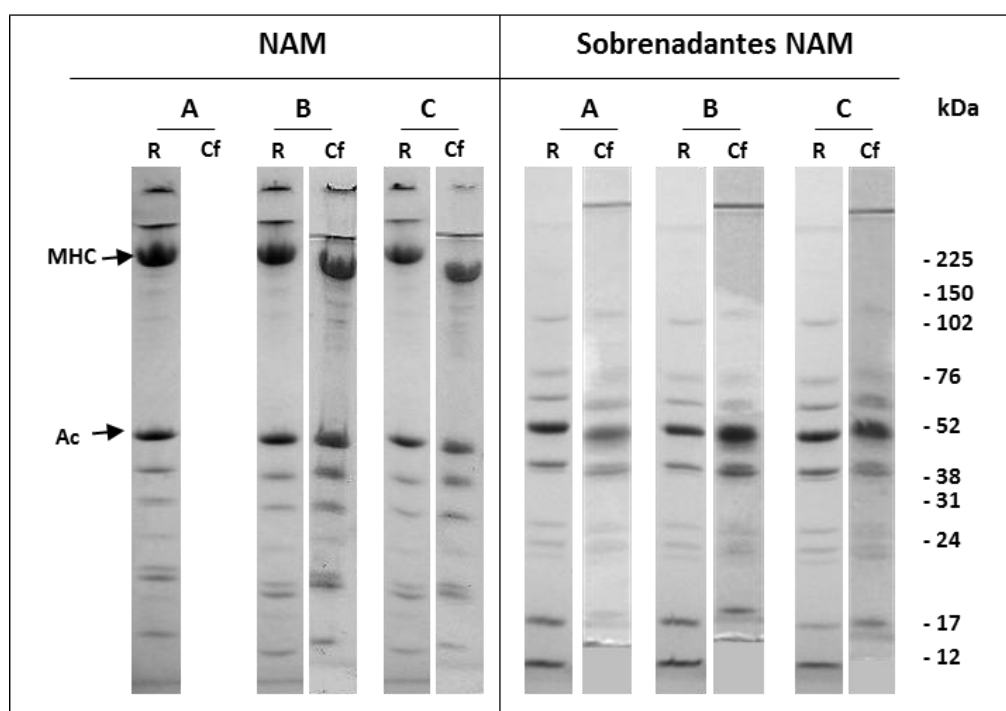


Figura 5.12 Patrón de electroforesis de actomiosina natural (NAM) y sobrenadantes de la extracción de NAM obtenidos de músculo de merluza infestado natural y artificialmente durante el control en refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) y a los 406 días de conservación en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$). **R**: Control en refrigeración; **Cf**: Control final en congelación; **MHC**: Cadena pesada de miosina; **Ac**: Actina. La proteína en todos los lotes se ajustó a 5 mg mL^{-1} .

El patrón de electroforesis de NAM de la proteína extraída a los 406 días de conservación en congelación de los lotes B y C, apenas presentó diferencias con relación al control en refrigeración (Figura 5.12). Las bandas observadas son las características para esta especie, la de mayor peso molecular corresponde a la cadena pesada de miosina (MHC), seguida por la actina (Ac) (Careche y Tejada, 1990; Tejada *et al.*, 2003b). Estos resultados concuerdan con estudios realizados en esta especie y otras especies de gádidos mantenidos en congelación por largos periodos de tiempo (Del Mazo *et al.*, 1999; Torrejón, 1996; Tejada *et al.*, 2003b).

Aunque no se encontraron cambios en las bandas de los sobrenadantes obtenidos en la extracción de NAM (Figura 5.12) al cuantificarlos se observaron variaciones en la cantidad de proteína extraída con el tiempo de conservación en congelación, tal como se observó previamente en la Figura 5.11-c.

En general, los resultados obtenidos ponen en manifiesto la influencia del grado de integridad del músculo en la capacidad de extracción de la proteína. Es evidente que se produce un mayor deterioro de la proteína en músculo picado que en músculo entero, confirmando lo observado por otros autores (Torrejón, 1996; Torrejón *et al.*, 1999).

En todos los lotes, las proteínas extraídas (PS/PT, NAM, Sobrenadantes de NAM) presentaron una tendencia a disminuir por efecto de la conservación en congelación, comportamiento que se asoció a la desnaturalización y/o agregación de las proteínas miofibrilares con la formación de enlaces interproteicos (Torrejón *et al.*, 1999; Tejada *et al.* 2003a). Los mayores cambios los presentó el lote A (músculo picado) que a partir de los 293 días de conservación se manifestó con una solubilidad proteica (PS/PT) inferior al 25% y agregación de toda la Actomiosina al no solubilizarse en las condiciones habituales de extracción. Esto nos indicó que en esta etapa los cambios originados en el músculo durante la conservación en congelación eran extremos (Tejada *et al.*, 2003a; 2003b).

5.2.3.4 Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

En la Figura 5.13 se representa la cantidad de Ani s 4 ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de merluza conservado en congelación. En todos los lotes con excepción del lote B, la detección de Ani s 4 presentó un comportamiento mayormente estable durante la conservación en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) del músculo infestado.

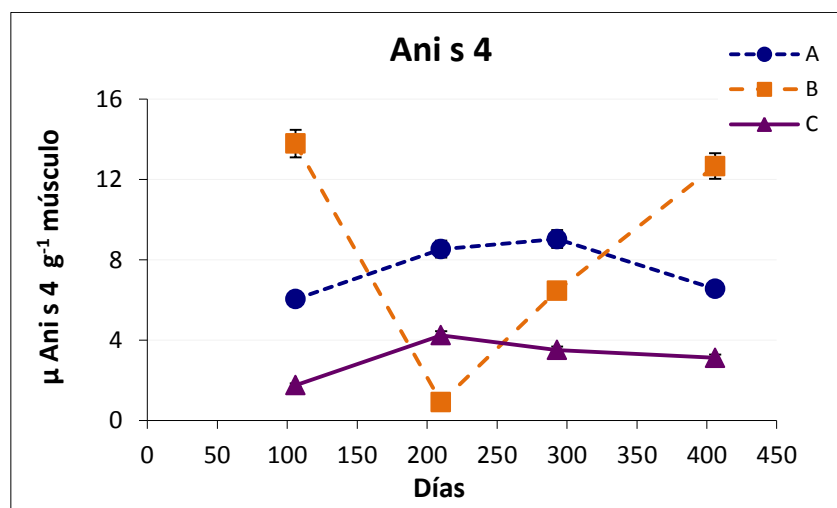


Figura 5.13 Evolución en el tiempo de Ani s 4 ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo merluza con infestación natural y artificial conservado en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$). **Lote A:** Músculo picado con infestación natural; **Lote B:** Músculo entero con infestación natural; **Lote C:** Músculo entero con infestación artificial (12 larvas/100 g músculo).

La cantidad de Ani s 4 detectada en el músculo del lote C (infestación artificial) fue significativamente inferior respecto a los lotes A y B (infestación natural) probablemente debido al tipo de infestación (tiempo transcurrido desde la infestación y cantidad de alérgeno excretado-secretado). Además, se ha verificado la variabilidad en la cantidad y tipo de antígenos y alérgenos en una misma especie de *Anisakis* y entre individuos (Rodríguez Mahillo *et al.*, 2007; Vidaček, *et al.*, 2011; Arizono *et al.*, 2012); inclusive en un mismo lote de larvas y pescado se han encontrado diferentes especies e híbridos de *Anisakis* (Abollo *et al.*, 2003; Martín-Sánchez *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2006; Abattouy, 2012).

Aunque se procuró utilizar zonas de músculo con tasas de infestación natural similares (lotes A y B), debemos considerar que el lote B al utilizar piezas enteras de músculo dorsal, permitió la posibilidad de encontrar porciones de músculo con distinta tasa de infestación natural, dando lugar a una bajada brusca en la detección de Anis 4 a los 210 días de conservación en congelación (Figura 5.13).

Se ha demostrado la presencia de antígenos de *A. simplex*, entre ellos el alérgeno Anis 4, en músculo de merluza infestada y almacenada durante 11 meses en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010).

Por otro lado, estudios realizados por microscopia electrónica ambiental (ESEM), indican que la congelación puede alterar la permeabilidad de la cutícula de *Anisakis* (Tejada *et al.*, 2006b). Estas modificaciones en las larvas implica que los alérgenos excretados-secretados del parásito se encuentran dispersos en el músculo y zonas próximas al sitio donde se encuentra el parásito (Solas *et al.*, 2008) y podrían influir en la cantidad de antígenos detectados durante la conservación en congelación.

Con la finalidad de comprobar el papel de la agregación de las proteínas musculares en la extracción de los alérgenos durante la conservación en congelación, se estudiaron los precipitados obtenidos en la extracción de alérgenos para inmunodetección (Apartado 3.2.6.2). La cantidad de proteína total en los precipitados (Figura 5.14) se incrementaron con el tiempo de conservación del músculo, sin embargo, no todas las proteínas cuantificadas fueron alergénicas y estos valores sólo nos dieron una referencia de la cantidad que se logró extraer con la técnica utilizada.

Los resultados de inmunohistoquímica (IHC) de los precipitados (Tabla 5.6) nos indican que aunque se detecta Anis 4, en general no se aprecia un incremento por área estudiada durante la conservación en congelación, si bien el volumen total del agregado obtenido fue mayor al incrementar el periodo de almacenamiento, confirmándonos así la alta sensibilidad de la detección por IHC.

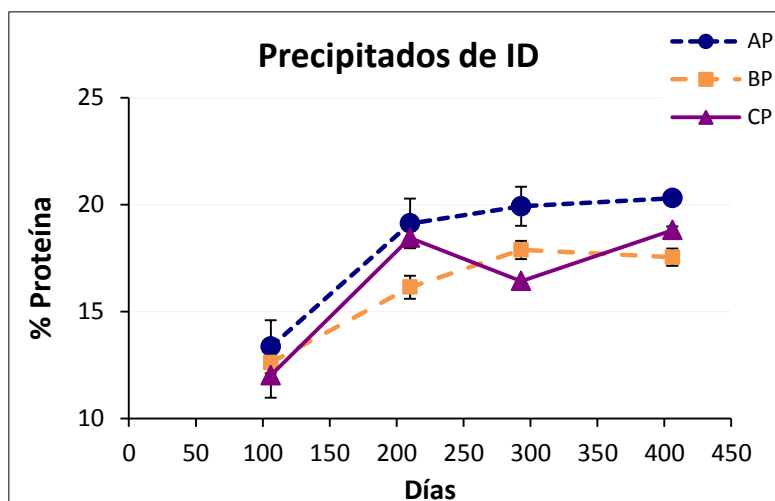


Figura 5.14 Variación del porcentaje de proteína bruta (%) de los precipitados obtenidos en la extracción para inmunodetección (ID) de músculo de merluza con infestación natural y artificial (≈ 12 larvas/100 g músculo) y conservado en congelación ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$).

Tabla 5.6 Densidad de etiquetado (Ns) con antígenos de Anisakis 4 en precipitados obtenidos de la extracción para inmunodetección de músculo de merluza con infestación natural y artificial (≈ 12 larvas/100 g músculo) y conservado en congelación ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 106 y 293 días.

Lote	Días	Ns
		(partículas de oro μm^{-2})
A	C106	4,69 \pm 0,51
	C293	3,59 \pm 0,42
B	C106	7,57 \pm 0,65
	C293	14,16 \pm 1,46
C	C106	15,95 \pm 1,80
	C293	10,05 \pm 0,84

Lote A: Músculo picado con infestación natural; **Lote B:** Músculo entero con infestación natural; **Lote C:** Músculo entero con infestación artificial (12 larvas/100 g músculo); **C106:** Conservación en congelación ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 106 días; **C293:** Conservación en congelación ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 293 días.

En la Figura 5.15 se presentan algunos ejemplos de la inmunolocalización de antígenos de Anisakis 4 en los precipitados obtenidos de la extracción para inmunodetección.

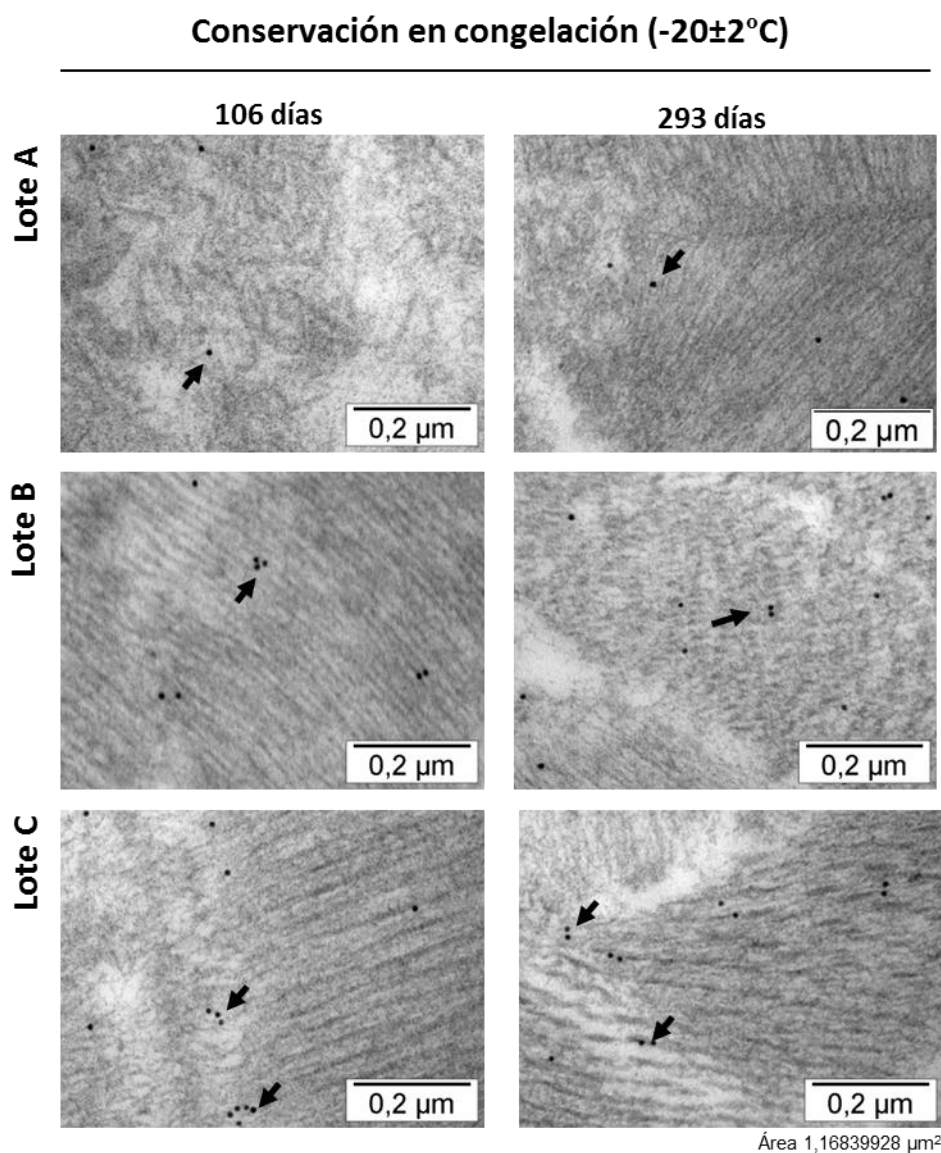


Figura 5.15 Inmunolocalización de antígenos de Anisakis 4 en precipitados obtenidos de la extracción para inmunotransferencia de músculo de merluza (*Merluccius merluccius*) infestado natural (lotes A y B) y artificialmente (lote C) y conservados en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 106 y 293 días. Las partículas de 10 nm de oro conjugado con el anticuerpo secundario aparecen en la micrografía como círculos oscuros, como los indicados por flechas.

La técnica de IHC, es un método de detección de alérgenos *in situ* muy sensible y apropiada cuando la estructura del músculo se encuentra modificada, tal como ocurre durante la congelación prolongada. Sin embargo, la eficacia de la técnica de inmunodetección por WB o DB depende de la extracción de las proteínas alergénicas de la matriz alimentaria.

En todos los lotes estudiados, pero con mayor intensidad en el lote A (músculo picado), el efecto de la conservación en congelación prolongada se manifestó en cambios en la solubilidad de las proteínas miofibrilares (PS/PT) y aunque apenas se observaron variaciones en la calidad de las proteínas extraídas, la cantidad de las mismas disminuyó con el tiempo de congelación, comportamiento que se observó tanto en NAM como en la proteína soluble obtenida en los sobrenadantes de la extracción de NAM.

En los lotes B y C con diferente tipo de infestación se detectó Ani s 4 en el músculo y la mayor cantidad se observó en el lote B con infestación natural.

En todos los casos la detección de Ani s 4 confirmó que la técnica de extracción de proteínas alergénicas en músculo infestado, no se vio influenciada por la formación de agregados proteicos durante la conservación en congelación, ni por la mayor cantidad de precipitado obtenido en la extracción de las proteínas para inmunodetección.

La presencia de Ani s 4 en el músculo infestado nos indica que la conservación en congelación prolongada no elimina la proteína alergénica pero si podría disminuir su capacidad alergénica aunque dependerá de las condiciones de conservación utilizadas.

5.3 Aplicación de la tecnología de obtención de surimi-geles

Surimi es un término japonés que significa músculo de pescado picado, su proceso de elaboración implica eliminar espinas, tejido conjuntivo y todo aquello que puede considerarse no funcional, para conseguir una concentración de actomiosina con un contenido acuoso similar al original del músculo de pescado (Suzuki, 1981; Tejada, 1991; Park y Lin, 2005). El surimi no es un producto final sino una materia prima, que por sus propiedades funcionales es utilizada para crear e imitar texturas y que puede servir de base para la elaboración de una amplia gama de productos, como el tradicional gel *kamaboko* japonés o productos de imitación de mariscos (Tejada y Borderías, 1987; Carvajal *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2006).

El procesamiento de surimi se puede dividir en dos etapas principales, la primera fase prepara el músculo de pescado, mientras que la segunda es la que implica el lavado y el tamizado de la carne picada (Suzuki, 1981; Martín-Sánchez *et al.*, 2009). Durante la preparación del músculo y dependiendo del tamaño del pescado, la separación de las partes blandas (músculo) de las porciones más groseras (espinas, piel, aletas y escamas) puede realizarse en equipos que introducen el pescado entre una cinta móvil de material flexible y un tambor con orificios de 3-5 mm de diámetro (Lee, 1984). La presión de la fuerza de cizalla ejercida por la cinta extrusiona el músculo a través de la perforaciones hacia el interior del tambor, logrando de esta forma una separación parcial del músculo ya que pequeñas espinas, algunas escamas y tejido conjuntivo también pasan través de los orificios de la criba (Borderías y Tejada, 1987).

El rendimiento del músculo en esta etapa varía entre 20-50% dependiendo del tamaño y especie de pescado y del tamaño de los orificios del tambor (Shimizu y Toyohara, 1992).

En los primeros procesos de obtención de surimi, el lavado se realizaba de forma discontinua en 5 ciclos, utilizando cantidades de agua cercanas a 30 o 40 veces la cantidad de pescado (Lin y Park, 1995). En la práctica industrial se ha logrado automatizar el proceso y aumentar la eficacia de los ciclos de lavado. En esta etapa el

músculo es lavado con agua con la finalidad de eliminar restos de sangre, impurezas, pigmentos, grasa, proteínas sarcoplásmicas y otros compuestos que puedan afectar la capacidad funcional de las proteínas miofibrilares (Sonu, 1986). Se ha considerado que las proteínas sarcoplásmicas intervienen negativamente, debido a que impiden la formación de la red necesaria para la formación del gel y al ser mayormente enzimas actúan proteolíticamente sobre el músculo (Nishioka, 1984).

El número de lavados y el volumen de agua utilizada varía en función a la especie, frescura, estructura de la unidad de lavado y la calidad requerida de surimi (Lee, 1984), por lo general son suficientes 3 ciclos de lavado de diez minutos cada uno empujando cada vez una cantidad de agua de tres o cuatro veces la del surimi (Borderías y Tejada, 1987). Asimismo, se ha establecido que la eficiencia de los lavados está determinada principalmente por el pH de la solución (Sonu, 1986), aunque no debemos dejar de lado otros factores como la relación agua:músculo, edad del pez, la forma del tanque de lavado, la velocidad de agitación, la forma del agitador y la temperatura del agua (Park y Lin, 2005). En lo que respecta al pH se recomienda valores de 6,5-7,5 a fin de mantener la estabilidad de la proteína miofibrilar y evitar el exceso de agua en el músculo (Okada, 1981; Park y Lin, 2005).

El exceso de agua absorbida por el músculo durante el lavado puede incrementarse desde 82-85% hasta 90-92% (Park y Lin, 2005), por lo que es necesario eliminar el exceso de agua antes de continuar con el proceso. La humedad se elimina parcialmente en un tambor perforado giratorio para posteriormente llegar a una prensa de tornillo con orificios de 0,5 a 1,5 mm de diámetro, en donde se quita el resto del agua en exceso. El contenido de humedad recomendado se encuentra entre 80 y 82% (Lee, 1984; Lanier, 1986; Alvarez *et al.*, 1990).

El refinado es una operación posterior a los lavados del músculo que dependiendo del proceso puede realizarse antes o después de la eliminación del agua en exceso en el lavado final. El refinado tiene como objetivos eliminar los pequeños fragmentos de espinas, escamas, restos de tejido conjuntivo u otras impurezas que todavía puedan acompañar al producto, así como eliminar el exceso de agua y concentrar las

proteínas miofibrilares para mejorar la gelificación (Mendes y Nunes 1992; Toyoda *et al.*, 1992). En la refinadora un grupo de cuchillas, que giran a elevada velocidad, impulsan el músculo picado a través de pequeños orificios de la parte del tambor (1,0-1,7 mm), saliendo el músculo finamente triturado al exterior, mientras que los elementos más groseros permanecen en el interior del equipo (Borderías y Tejada, 1987; Park y Lin, 2005).

Las proteínas miofibrilares pierden su funcionalidad rápidamente en congelación al cambiar la estructura del músculo, por lo que para la conservación del surimi es necesario adicionar crioprotectores (Matsumoto y Noguchi, 1992; Carbajal *et al.*, 2005). Los crioprotectores son utilizados a fin de evitar la agregación de las proteínas miofibrilares durante la conservación en congelación, y de esta forma conservar su funcionalidad y capacidad de formar geles resistentes y elásticos (Matsumoto y Noguchi, 1992). En la industria del surimi los crioprotectores más utilizados son la sacarosa y el sorbitol o una mezcla de ambos, en cantidades que no superan el 8% del peso del surimi. Por lo general, el sorbitol es el más empleado debido a que proporciona menos sabor dulce y no potencia posibles reacciones de pardeamiento (Matsumoto y Noguchi, 1992; Sultanbawa, 1999). Otros aditivos muy utilizados son los polifosfatos, que se añaden hasta en concentraciones de 0,3% ya que cantidades superiores pueden proporcionar al surimi un sabor desagradable (Suzuki, 1981; Park *et al.*, 1988; Park, 1994).

La adición de estas sustancias por lo general se realiza en una mezcladora y para proteger a las proteínas miofibrilares durante esta operación es necesario evitar temperaturas superiores a 5°C y además de ser posible trabajar en condiciones de vacío para impedir la incorporación de aire a la masa (Borderías y Tejada, 1987; Park y Lin, 2005).

En la práctica industrial los procesos de lavado están automatizados, y en el caso de plantas de procesamiento a bordo de algunos barcos factoría se lavan dos veces, con una proporción agua:músculo de 2:1 y para evitar el excesivo uso de agua dulce, en el

primer lavado de cada lote se utiliza el agua procedente del segundo lavado del lote anterior (Borderías y Tejada, 1987).

La forma comercial de comercialización del surimi es en bloques de 10 kg, de 10 cm de alto, envasados en bolsas de plástico. Durante la etapa de congelación es necesario que el bloque alcance rápidamente una temperatura de -25°C a fin de evitar la formación de grandes cristales de hielo. El posterior almacenamiento en congelación no deber superar los -20°C , aunque una mejor conservación se evidencia a los -30°C (Okada, 1967; Borderías y Tejada, 1987; Park y Lin, 2005).

La propiedad más importante del surimi es su capacidad para formar geles con una textura y consistencia que no puede igualarse con otro tipo de proteínas de uso alimentario (Tejada y Borderías, 1987; Tejada, 1991). Los geles de surimi una vez formados tienen la característica de ser termo-resistentes y pueden volverse a calentar sin que se disgreguen, asimismo tienen una alta capacidad de retención de agua, propiedades elásticas acentuadas y casi no presentan sinéresis (Lanier *et al.*, 2005).

Para fabricar un gel de surimi es necesario adicionar sal al surimi previamente descongelado en una concentración entre 2,5-3,0% (Suzuki, 1981; Park y Lin, 2005). Este proceso se realiza en una amasadora-mezcladora controlando que la temperatura no se eleve por encima de los 10°C . Bajo estas condiciones las miofibrillas del músculo se separan, se solubilizan los miofilamentos y la actomiosina pierde su estructura original, quedando en condiciones de interaccionar entre si o con el agua (Tejada y Borderías 1987). En esta etapa se obtiene una pasta plástica muy viscosa, que posteriormente puede ser sometida a diferentes condiciones de tratamiento térmico para formar el gel definitivo.

Cuando la pasta elástica obtenida en la etapa anterior es sometida a temperaturas por debajo de 40°C , se forma un gel traslúcido denominado por los japoneses *suwari*, y si luego este gel es calentado a temperaturas superiores a 80°C se consiguen geles del tipo *kamaboko* opacos y de elevada elasticidad (Suzuki, 1981; Tejada y Borderías, 1987; Tejada, 1991). En la industria a este proceso se le denomina método

de doble tratamiento térmico. Otra forma de obtener un gel tipo *kamaboko* es por calentamiento directo, en este caso la estructura del gel es diferente obteniéndose geles opacos más heterogéneos con una mayor intensidad de coagulación y una menor retención de agua (Suzuki 1981; Alvarez, 1993, Tejada *et al.*, 1995).

Existe otra metodología de obtención de surimi (Hultin y Kelleher, 1999; 2000) en la que se recuperan mayor cantidad de proteínas, con lo que se aumenta el rendimiento del producto final. Sin embargo, este proceso no se ha utilizado en el presente trabajo ya que parte de los alérgenos de *Anisakis* que se pretenden eliminar pueden encontrarse entre las proteínas recuperadas.

Aunque en el procesado y conservación de surimi y durante la producción de geles de surimi la congelación o el tratamiento térmico aplicado producen la muerte de as larvas de *Anisakis*, el efecto de este procesado en los alérgenos de *Anisakis* aún no está estudiado.

En la Figura 5.16 se presenta el esquema general del proceso de elaboración de surimi y geles utilizado en el presente estudio. En apartados posteriores se describen los diversos trabajos realizados en este proceso tecnológico y para un mejor análisis se ha dividido el proceso en 4 etapas principales, en cada una se han planteado objetivos específicos a fin de evaluar en la primera etapa la influencia en las larvas y en las posteriores el comportamiento de los alérgenos de *Anisakis* y valorar su potencial alergénico en surimi y productos derivados del surimi.

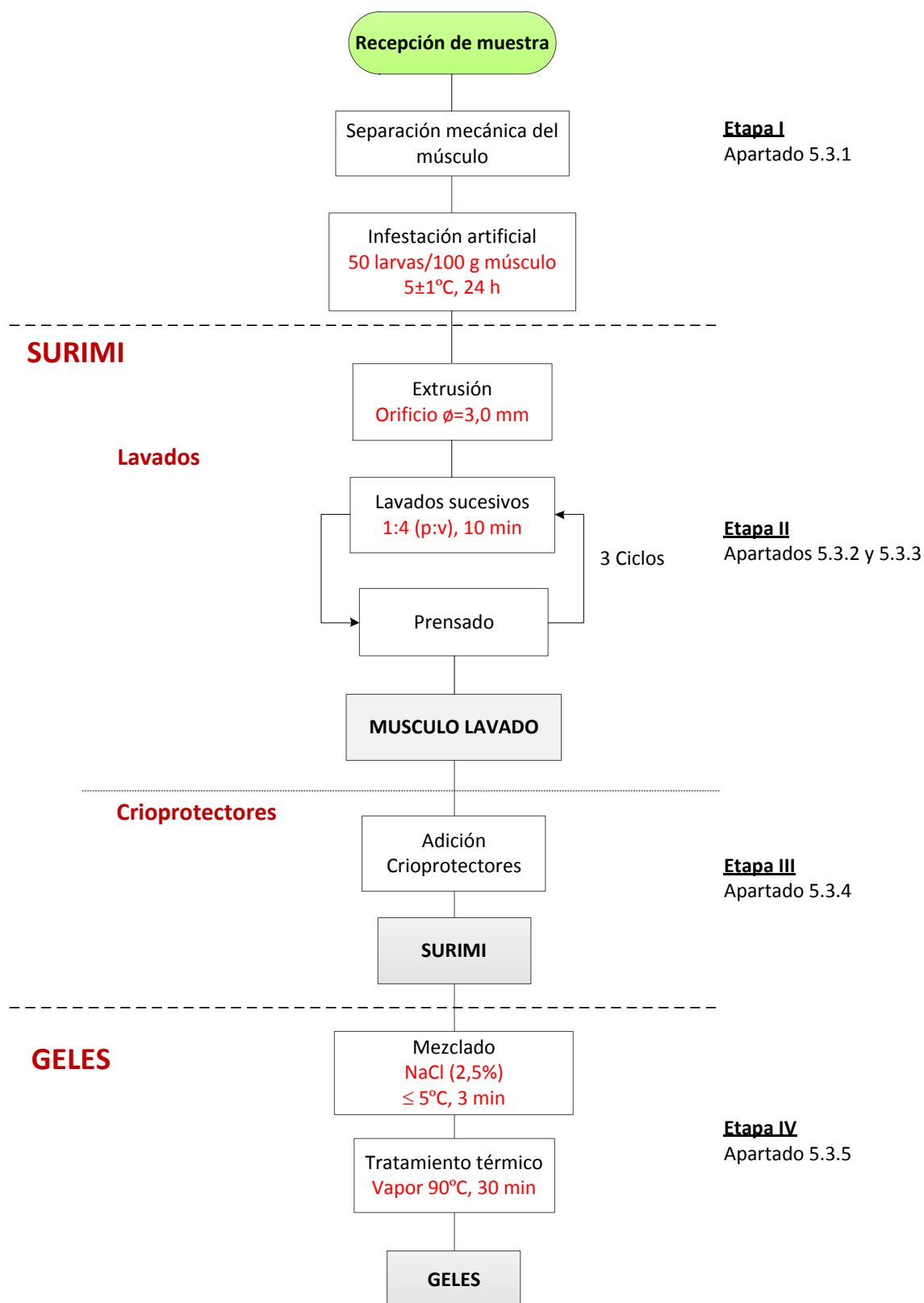


Figura 5.16 Esquema general de elaboración de surimi y geles de surimi

5.3.1 Efecto de la separación mecánica del músculo

5.3.1.1 Objetivo

El objetivo de la primera etapa del proceso general de obtención de surimi y geles (Etapa I) fue evaluar la retención-eliminación y la viabilidad de las larvas de *Anisakis* después de hacer pasar el músculo infestado a través de tamices individuales (simulación de extrusionado) o sucesivos (simulación de extrusionado y refinado) con diferentes diámetros del orificio (3,5; 3,0 y 2,0 mm).

5.3.1.2 Diseño del experimento

En la Figura 5.17 se presenta el esquema general del experimento mientras que en la Figura 5.18 se muestran algunas imágenes de las operaciones realizadas a lo largo del proceso.

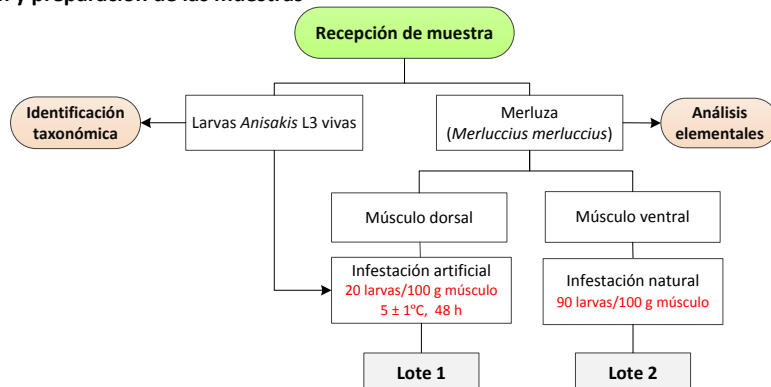
5.3.1.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Larvas de *Anisakis* spp.

Las larvas vivas de *Anisakis* en la tercera fase (L3) fueron obtenidas de ovarios de merluzas (*Merluccius merluccius*) infestadas, procedentes del Atlántico noroeste y recepcionadas en Mercamadrid en el mes de marzo del 2011. Se utilizó un lote de aproximadamente 100 g de larvas incluyendo tejidos de vísceras que se almacenaron a $5\pm1^{\circ}\text{C}$.

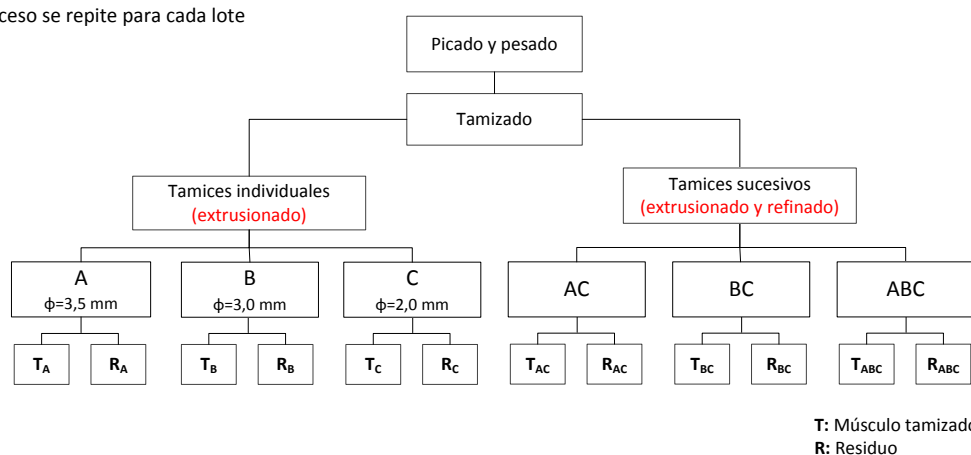
La preparación de las larvas y la identificación taxonómica se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

Recepción y preparación de las muestras



Obtención del músculo separado mecánicamente

Este proceso se repite para cada lote



Análisis de las muestras

Músculo tamizado y residuo de cada lote y tipo de tamizado

Lote: n=1 y 2

Tipo tamiz: x=A, B, C, AC, BC y ABC

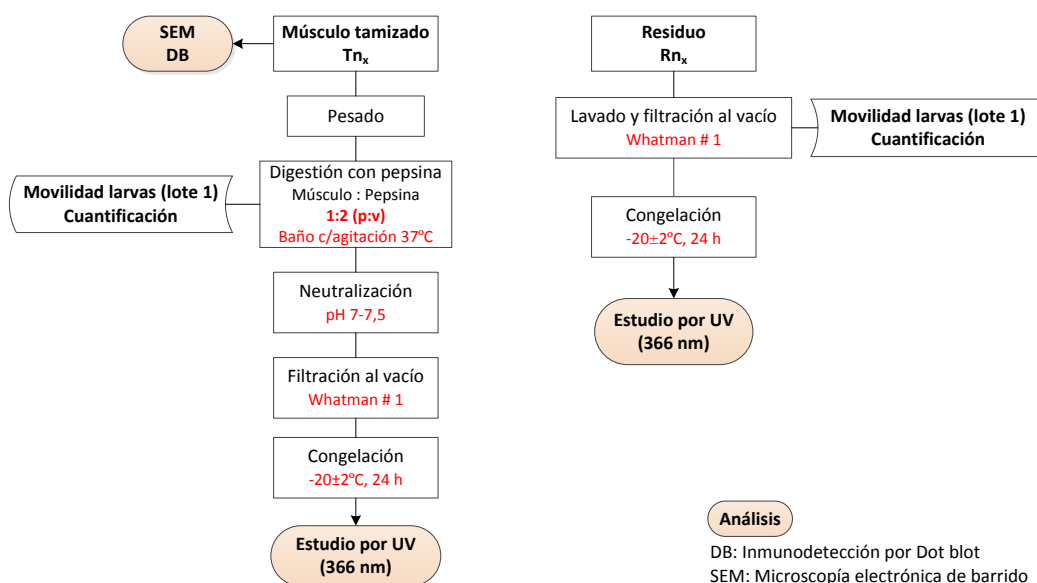


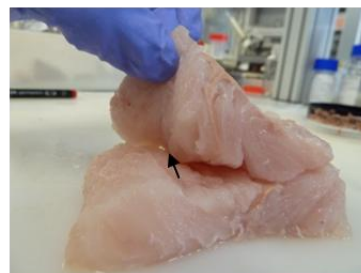
Figura 5.17 Esquema del estudio de la separación mecánica de músculo de merluza con infestación natural y artificial.

Lote 1: Músculo dorsal con infestación artificial (larvas vivas)

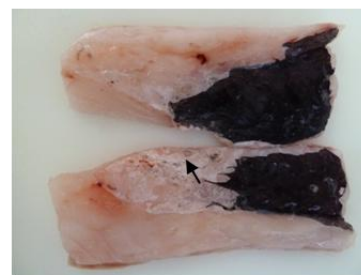
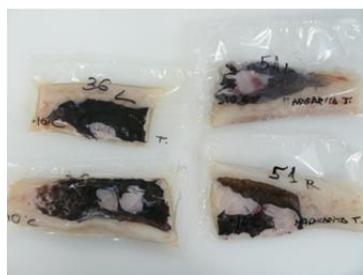
Limpieza y fileteado



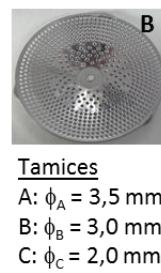
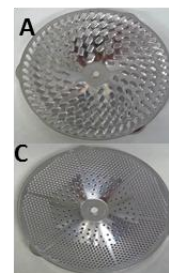
Infestación artificial (tipo sándwich)



Lote 2: Músculo ventral con infestación natural (larvas muertas)



Obtención del músculo separado mecánicamente



Tamices

A: $\phi_A = 3,5 \text{ mm}$

B: $\phi_B = 3,0 \text{ mm}$

C: $\phi_C = 2,0 \text{ mm}$



Figura 5.18 Imágenes de las operaciones realizadas durante la obtención del músculo tamizado. Las flechas señalan ejemplos de larvas encontradas.

Pescado utilizado

Se utilizó parte del lote de merluzas (*Merluccius merluccius*) recepcionadas para el experimento descrito en el Apartado 4.1.2.1 y conservadas en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante un periodo máximo de 9 meses. Se utilizaron 4 merluzas previamente descongeladas y cortadas en filetes. El peso final de los filetes fue de 1,8 kg y fueron utilizados para el estudio de infestación artificial. La temperatura durante la manipulación de las muestras fue $\leq 5^{\circ}\text{C}$.

Para el estudio de infestación natural, además de los músculos ventrales del lote anterior y debido a su baja tasa de infestación (≤ 5 larvas/100 g músculo), se utilizó un lote adicional de músculos ventrales con alta tasa de infestación (116 larvas/100 g músculo) obtenidos de merluzas capturadas en la zona de pesca VIa-FAO 27, envasados a vacío y conservados en congelación a $-30\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 16 meses. En total se utilizaron 1,8 kg de musculatura ventral (izquierdos y derechos) previamente descongelados en cámara a $\leq 5^{\circ}\text{C}$. La mezcla de músculos ventrales obtuvo una tasa de infestación promedio de 90 larvas por cada 100 g de músculo.

Preparación de las muestras

Dependiendo del tipo de músculo a utilizar se prepararon 2 lotes, que se estudiaron individualmente.

- Lote 1: Músculo dorsal con infestación artificial (larvas vivas)

Para la infestación artificial de los filetes de merluza, las larvas vivas de *Anisakis* se colocaron entre dos capas de músculo (tipo sándwich) en una proporción de 20 larvas por cada 100 g de músculo. Los filetes infestados se almacenaron en condiciones de refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante un máximo de 48 horas para favorecer la penetración de las lavas en el músculo (Tejada *et al.*, 2006a; 2006b).

- Lote 2: Músculo ventral con infestación natural (larvas muertas)

Para este lote se utilizó la mezcla de músculos ventrales del lote anterior y músculos ventrales descongelados descritos previamente. El lote 2 obtuvo una tasa de infestación promedio de 90 larvas por cada 100 g de músculo.

Los músculos infestados de cada lote fueron troceados con cuchillo y homogenizados por separado en una batidora-picadora (Hand processor accesory, Minipimer 5, Braun GmbH, Alemania) a baja velocidad y con toques suaves a fin de evitar romper las larvas. El homogenizado obtenido para cada lote fue distribuido en 18 muestras de 100 g cada una.

Para la operación de tamizado (simulación de extrusionado y refinado), con la ayuda de un molino de alimentos (OXO Good Grips, UK) el músculo dorsal (lote 1) o músculo ventral (lote 2) fue pasado a través de tamices individuales o sucesivos con diferentes diámetros de orificio (Tamiz A: $\phi_A=3,5$ mm; Tamiz B: $\phi_B=3,0$ mm; Tamiz C: $\phi_C=2,0$ mm).

Para cada lote se obtuvieron 6 tipos de músculos tamizados con sus correspondientes residuos y cada operación de tamizado se realizó por triplicado (Figura 5.17). La temperatura de las muestras durante el procesado fue $\leq 5^{\circ}\text{C}$

5.3.1.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

En cada lote se evaluó la retención de las larvas en los tamices y la presencia de larvas en el músculo después de pasar a través de tamices individuales o sucesivos. En la Figura 5.19 se presentan algunas imágenes de los análisis realizados en las muestras.

Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

Para los estudios de identificación taxonómica, se siguió el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

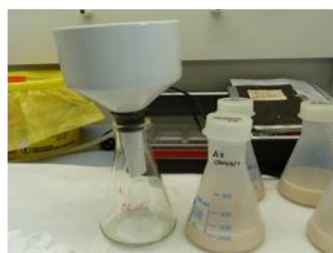
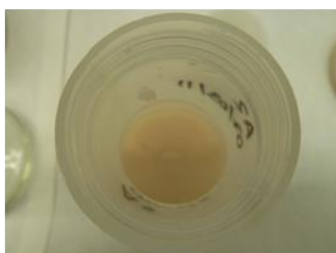
Análisis elementales y pH

Se realizaron los análisis elementales y pH del músculo inicial. El protocolo de la técnica se describe en el Apartado 3.2.2.

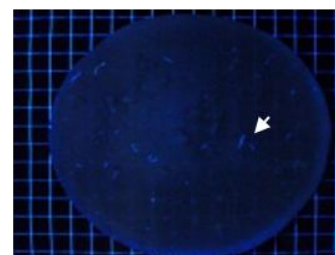
Músculo tamizado (Tn_x)



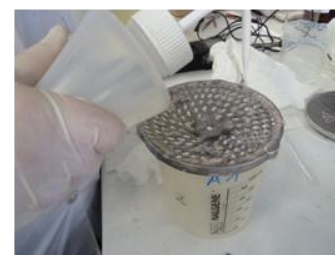
Digestión con pepsina



Estudio con luz UV (366 nm)



Residuo (Rn_x)



Estudio con luz UV (366 nm)

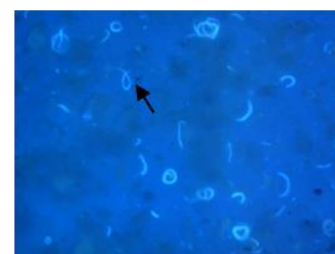
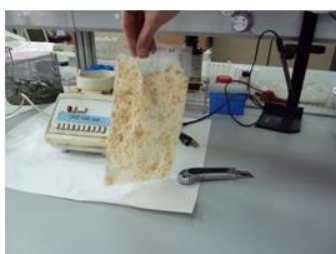


Figura 5.19 Imágenes de los análisis en las muestras de trabajo: Músculo tamizado (Tn_x) y Residuo (Rn_x). Las flechas señalan ejemplos de larvas encontradas.

Cuantificación de larvas

a. Digestión con pepsina

Para cuantificar y/o verificar la viabilidad de las larvas, las muestras de los lotes 1 y 2 pasadas a través de distintos tamices (Tn_x) fueron digeridas con solución de pepsina a una concentración final de 0,3 M HCl, 10 mg mL⁻¹ pepsina [actividad proteolítica 1:10000 NF (2000 FIP-U g⁻¹), Panreac, Castellar del Vallés, España], pH≤1,1 (CODEX STAN, 2004). La relación muestra-solución de pepsina utilizada fue de 1:2 (p:v) (Ozanz Mur, 2001; Tejada *et al.*, 2006; Vidaček *et al.*, 2009c). Durante la digestión las muestras fueron incubadas en baño de agua (37±0,5°C) con agitación constante y el tiempo de digestión fue de 30 minutos o hasta que el músculo estuvo completamente digerido. Una vez terminada la digestión, las muestras se enfriaron inmediatamente en agua con hielo y se neutralizaron para evitar que la pepsina continuara ejerciendo su efecto.

Con el fin de facilitar la cuantificación de las larvas enteras vivas o muertas, los músculos digeridos (Tn_x) y los residuos del tamizado (Rn_x) fueron filtrados al vacío en matraz kitasato y filtro de papel Whatman #1 (Cat No 1001 125, GE Healthcare UK Limited). Se evaluó la movilidad de las larvas en la muestra retenida en los filtros y posteriormente para el estudio de emisión de fluorescencia los filtros fueron congelados (-20±2°C) durante 48 horas.

b. Movilidad

Este procedimiento sólo se realizó en las muestras (Tn_x , Rn_x) del lote 1 (infestación artificial con larvas vivas). Se verificó visualmente el movimiento espontáneo o estimulado (tocando las larvas con una aguja sin dañar la larva) de las larvas presentes en los filtros. Cuando no se observó movimiento se consideró que la larva estaba muerta (Solas *et al.*, 2008; Vidacek *et al.*, 2010). Se contabilizaron las larvas vivas.

c. Emisión de fluorescencia

Para contabilizar las larvas enteras muertas de ambos lotes (lotes 1 y 2), las muestras se colocaron en cámara oscura, se observaron con luz ultravioleta (366 nm)

y se tomaron fotografías con una cámara digital (Coolpix 5000, Nikon, Tokyo, Japón) con luz visible y luz ultravioleta (366 nm). La fluorescencia emitida por las larvas con luz ultravioleta permitió verificar su presencia, integridad y cuantificación.

En todas las muestras (T_{n_x} , R_{n_x}) se contabilizaron las larvas enteras y por diferencia se obtuvo la cantidad de larvas rotas. Se calculó el porcentaje de retención de larvas en cada tipo de tamizado.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

El análisis sólo se realizó en las muestras correspondientes al lote 2 (infestación natural, larvas muertas) y tuvo como finalidad evaluar las modificaciones en el músculo tamizado. El protocolo de la técnica se describe en el Apartado 3.2.5.

Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

La extracción de proteínas alergénicas e inmunodetección por DB sólo se realizó en las muestras del lote 2 (Apartados 3.2.6.2).

5.3.1.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado se describe en el Apartado 3.3.

5.3.1.3 Resultados y discusión

5.3.1.3.1 Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis*

Morfológicamente las larvas del lote 1 fueron clasificadas como tipo I e identificadas como *Anisakis simplex* s.s. (88,57%) y *Anisakis pegreffii* (11,42%).

5.3.1.3.2 Rendimiento del músculo

El rendimiento del músculo obtenido después del tamizado osciló entre 60 y 80%, dependiendo del tamiz utilizado y del lote estudiado, tal como se observa en la

Figura 5.20. No se encontraron diferencias significativas en el rendimiento entre los lotes 1 y 2 para el mismo tipo de tamiz. Sin embargo, se aprecia en el mismo lote una disminución significativa en el rendimiento cuando el músculo pasa a través de tamices sucesivos y se obtuvieron los menores rendimientos cuando las muestras se sometieron al tamizado con tres tamices sucesivos (ABC), encontrándose en este caso diferencias significativas entre lotes.

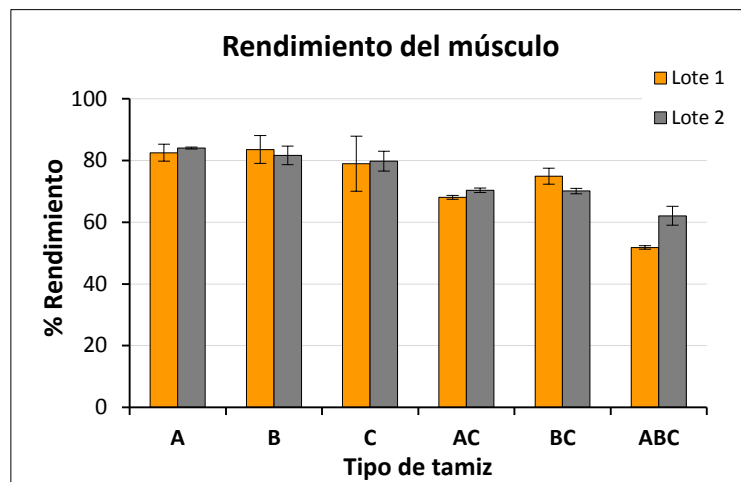


Figura 5.20 Rendimiento (%) del músculo de merluza obtenido después de la operación de tamizado. **Lote 1:** Músculo dorsal con infestación artificial (larvas vivas, 20 larvas/100 g músculo); **Lote 2:** Músculo ventral con infestación natural (larvas muertas, 90 larvas/100 g músculo). **Diámetro de los orificios de los tamices:** Tamiz A, $\phi_A=3,5$ mm; Tamiz B, $\phi_B=3,0$ mm; Tamiz C, $\phi_C=2,0$ mm.

5.3.1.3.3 Cuantificación de larvas enteras

En ambos lotes, el porcentaje de larvas enteras (vivas y muertas) en el músculo tamizado disminuyó significativamente al extrusionarlas a través del tamiz de diámetro inferior (C), y sobre todo cuando pasó a través de tres tamices sucesivos (ABC), tal como se observa en la Figura 5.21.

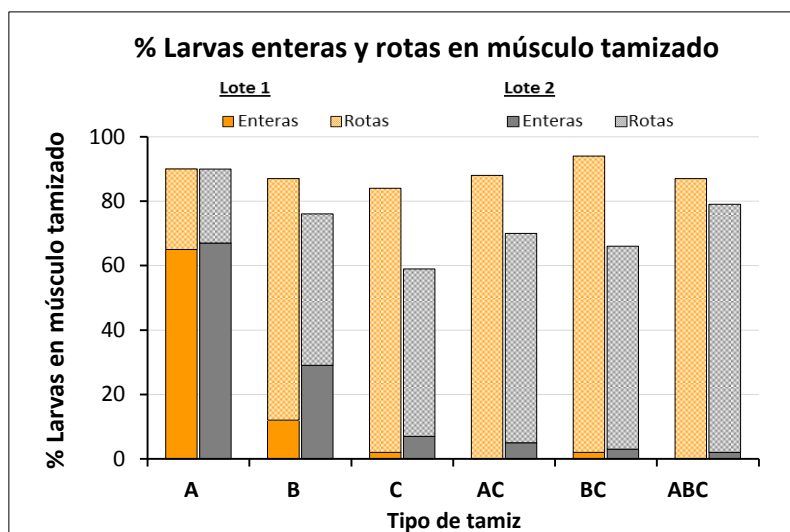


Figura 5.21 Porcentaje (%) de larvas L3 de *Anisakis* enteras y rotas en músculo tamizado de merluza. **Lote 1:** Músculo dorsal con infestación artificial (larvas vivas, 20 larvas/100 g músculo); **Lote 2:** Músculo ventral con infestación natural (larvas muertas, 90 larvas/100 g músculo); **Diámetro de los orificios de los tamices:** Tamiz A, $\phi_A=3,5$ mm; Tamiz B, $\phi_B=3,0$ mm; Tamiz C, $\phi_C=2,0$ mm.

En el lote 1 (infestación artificial, larvas vivas) después de la digestión con pepsina, se encontraron 4 larvas vivas en las muestras refinadas con tamiz A y 1 larva viva con las del tamiz B, confirmando la resistencia de las larvas en condiciones de acidez extrema (Solas *et al.*, 2008; Vidaček *et al.*, 2009c). Las larvas con cutícula intacta son estables a condiciones de digestión, sin embargo, si la cutícula se encuentra alterada por algún proceso, las larvas se pueden digerir y su recuperación es menor a la esperada (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008; Solas *et al.*, 2009).

Por otro lado, la presencia de un alto contenido de larvas rotas en el músculo pasado a través de tamices sucesivos, indica que puede producirse la rotura de estructuras de la larva como la glándula excretora, lo que en un inicio podría provocar una mayor propagación de antígenos en el músculo, en especial después de utilizar tamices con un orificio de diámetro más pequeño.

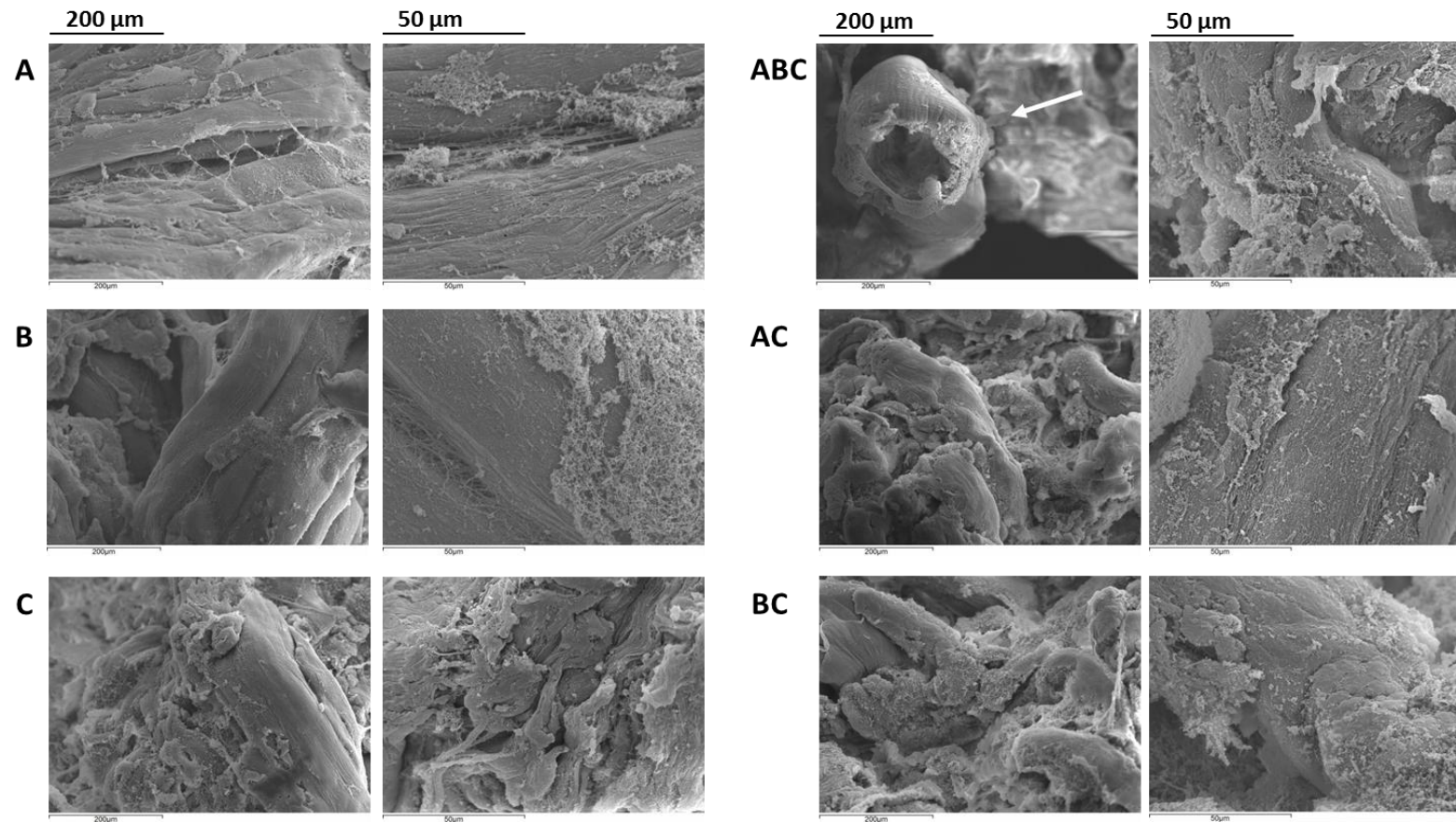


Figura 5.22 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de músculo ventral de merluza con infestación natural (lote 2) obtenido después de la operación de tamizado. **Tipo de tamizado según el diámetro de los orificios:** **A**-Tamiz A, $\phi_A=3,5$ mm; **B**-Tamiz B, $\phi_B=3,0$ mm; **C**-Tamiz C, $\phi_C=2,0$ mm; **AC**-Combinación de tamices A y C; **BC**-Combinación de tamices B y C; **ABC**-Combinación de tamices A, B y C. La flecha señala la presencia de una larva.

5.3.1.3.4 Microestructura del músculo tamizado (Tn_x)

En la Figura 5.22 se presentan imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) del músculo ventral tamizado (lote 2).

El estudio microscópico del músculo nos indica que existe un proceso gradual de ruptura de las fibras musculares por la acción del tamizado. Las diferencias estructurales en el músculo se observan mejor en las muestras que han sido refinadas con tamices sucesivos, en especial aquellas con menor diámetro de orificio (AC y BC).

En la muestra obtenida con la combinación de tamices ABC, sometida al paso sucesivo por tamices de orificios de diámetros descendientes, se encontró la presencia de larvas prácticamente enteras (Figura 5.22: micrografía a 200 μm , tamizado ABC y Figura 5.23). El diámetro de las larvas L3 oscila entre 0,10 y 0,15 mm lo que justificaría su presencia en el músculo tamizado.

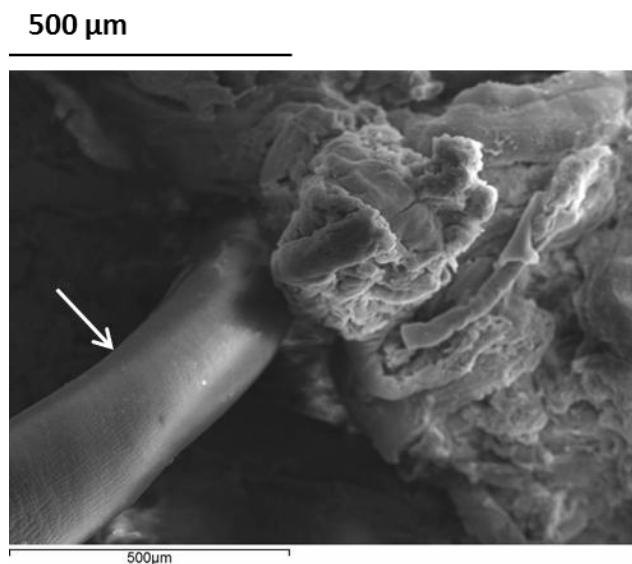


Figura 5.23 Micrografía del cuerpo de una larva de *Anisakis* spp. encontrada en músculo ventral de merluza (lote 2) tamizado con una combinación de tamices sucesivos (ABC). La presencia de la larva se indica con una flecha.

5.3.1.3.5 Inmunodetección por DB de las proteínas alergénicas

La inmunodetección por DB se realizó en las muestras correspondientes al lote 2 (infestación natural, larvas muertas) y se utilizó como control la muestra correspondiente a la musculatura ventral sin tamizar. Anís 4 sólo se detectó en el músculo pasado a través de la combinación de tres tamices (ABC), mientras que antígenos de Extracto crudo de *A. simplex* fueron detectados en todas las muestras, tal como se observa en la Figura 5.24.

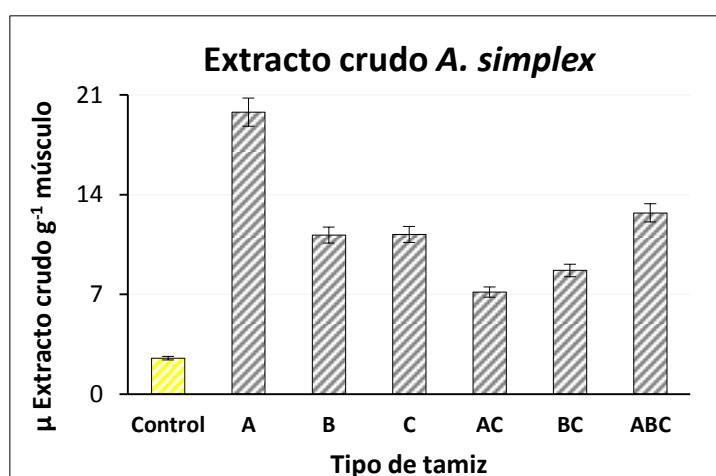


Figura 5.24 Cantidad de Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo ventral con infestación natural (90 larvas/100 g músculo) (lote 2) luego de la operación de tamizado. **Diámetro de los orificios de los tamices:** Tamiz A, $\phi_A=3,5$ mm; Tamiz B, $\phi_B=3,0$ mm; Tamiz C, $\phi_C=2,0$ mm.

La detección de alérgenos en los tamizados podría estar relacionada con la retención de larvas en el tamiz o con la presencia de larvas rotas en el músculo tamizado. De acuerdo a nuestros resultados, la mayor detección se observó en el músculo pasado a través del tamiz A, probablemente debido al mayor porcentaje de larvas enteras retenidas en el músculo tamizado. En el caso de los músculos en los que se utilizaron tamices sucesivos (AC, BC y ABC) se observó un ascenso en la detección de Extracto crudo de *A. simplex* a medida que aumentaba el porcentaje de larvas rotas

presentes en el músculo tamizado, encontrándose diferencias significativas entre tipo de tamizado.

Por otro lado, debemos considerar que la musculatura ventral utilizada en el lote 2 (infestación natural, larvas muertas) se había mantenido en congelación ($-30\pm 3^{\circ}\text{C}$) durante 16 meses y aunque se ha demostrado la presencia de alérgenos en músculo congelado por largos periodos de tiempo (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010), también se ha evidenciado una variabilidad en la inmunodetección de los mismos, sobre todo en Anís 4, como se ha descrito en los Apartados 4.1 y 5.2.

Los resultados de inmunodetección confirmaron en cierta medida la hipótesis de una posible propagación de antígenos en el músculo luego de ser tamizado, aunque dependerá del tipo de tamiz utilizado.

En la industria una operación de refinado, dependiendo del diámetro de orificio del tambor, implicaría una mayor retención de larvas y en consecuencia una menor cantidad en el músculo refinado, pudiendo considerarse que este proceso disminuye la presencia de larvas en el músculo en lotes de pescado o zonas anatómicas con alta tasa de infestación.

5.3.2 Estudios preliminares de lavados y determinación de límites de detección de alérgenos de *Anisakis*

5.3.2.1 Lavados sucesivos tipo surimi y concentración de proteínas de las soluciones de lavado

Como se ha señalado en el Apartado 5.3, la operación de lavado del músculo de pescado es uno de los pasos claves en la fabricación de surimi. Es considerada como una operación necesaria para evitar la desnaturalización de la proteína miofibrilar durante el almacenamiento en congelación (Park y Lin, 2005).

En la industria, los ciclos de lavado suelen tener una duración entre 9 y 12 minutos empleándose en cada lavado una cantidad de agua de 3 a 4 veces el peso del músculo (Park y Lin, 2005; Martín-Sánchez *et al.*, 2009).

Por otro lado, es bien sabido que las proteínas miofibrilares son más estables a pH neutro, y que el pH no sólo afecta al grado de desnaturalización a altas temperaturas, sino que también afecta al grado de desnaturalización durante el almacenamiento en congelación (Borderías y Tejada, 1987). Es así, que a valores de pH por debajo de 6,5 las proteínas miofibrilares son inestables y rápidamente pierden su actividad ATP-ásica, como un indicador de la capacidad de formar gel (Fukuda *et al.*, 1981).

En lo que respecta a proteínas alergénicas de *Anisakis*, se vienen estudiando algunas de sus características químicas y bioquímicas, tales como su estructura, punto isoeléctrico, grupos -SH, entre otros. Estas características tienen gran importancia, ya que pueden proporcionar estabilidad al alérgeno durante la aplicación de procesos tecnológicos, manteniendo sus propiedades alergénicas a pesar de que dichos procesos produzcan la muerte de las larvas, o por el contrario, extraerse en algunos de los procesos de elaboración de surimi, fundamentalmente en los procesos de lavado, o formar enlaces con proteínas musculares desnaturalizadas durante el procesado y perdiendo dichas propiedades alergénicas.

Concentración de proteínas alergénicas para su detección

Aunque estudios previos (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2008) indican que este método permite la detección de Anisakis en concentraciones inferiores a 1 ppm, en estudios preliminares realizados en músculo de pescado infestado no se logró identificar con claridad la presencia de Anisakis en las aguas de lavado. Se consideró que si el alérgeno se encuentra en el interior de las larvas, su extracción para la detección sea menor, o que dadas las condiciones del tratamiento las proteínas alergénicas extraídas se encuentren muy diluidas quedando por debajo del límite de detección. Se consideraron dos alternativas de concentración que a continuación se describen.

a. Concentración con disolventes orgánicos (EtOH)

La precipitación selectiva de las proteínas es una propiedad muy importante para su aislamiento y purificación. Los disolventes orgánicos miscibles en agua como el etanol, al interaccionar con el interior hidrófobo de las proteínas, desorganizan la estructura terciaria, provocando su desnaturalización y precipitación. Aunque este tipo de concentración ofreció ciertas incompatibilidades con el tipo de muestra a analizar, se utilizó con la finalidad de verificar la viabilidad de la técnica.

b. Concentración por ultrafiltración (UF)

La ultrafiltración es un tipo de filtración en el que se utiliza membranas para separar diferentes tipos de sólidos y líquidos. Esta técnica se utiliza en procesos de concentración y fraccionamiento de sustancias, sobre todo proteínas, donde la separación ocurre por un efecto de tamización molecular (Wilson y Burns 1983; Paulson *et al.*, 1984).

5.3.2.1.1 Objetivo

En los estudios preliminares de la etapa de lavado (Etapa II del proceso general de obtención de surimi y geles) se plantearon dos objetivos:

- Estudiar diferentes condiciones de lavado con la finalidad de evaluar en las aguas de lavado la actividad alergénica de las proteínas eliminadas del músculo por solubilizaciones selectivas.
- Utilizar diferentes técnicas de concentración de proteínas, que permitieran detectar claramente la presencia de Ani s 4 a bajas concentraciones, pero que a su vez no provocasen pérdidas de proteínas o interferencias en la detección final.

Para lograr los objetivos, se tomaron en cuenta los puntos isoelectrónicos de los principales alérgenos descritos de *Anisakis* a fin de poder extraerlos y detectarlos en la solución de lavado y músculo después del 3º lavado según corresponda. Se aplicó la metodología basada en la obtención de surimi por método tradicional japonés (Suzuki, 1981).

5.3.2.1.2 Diseño del experimento

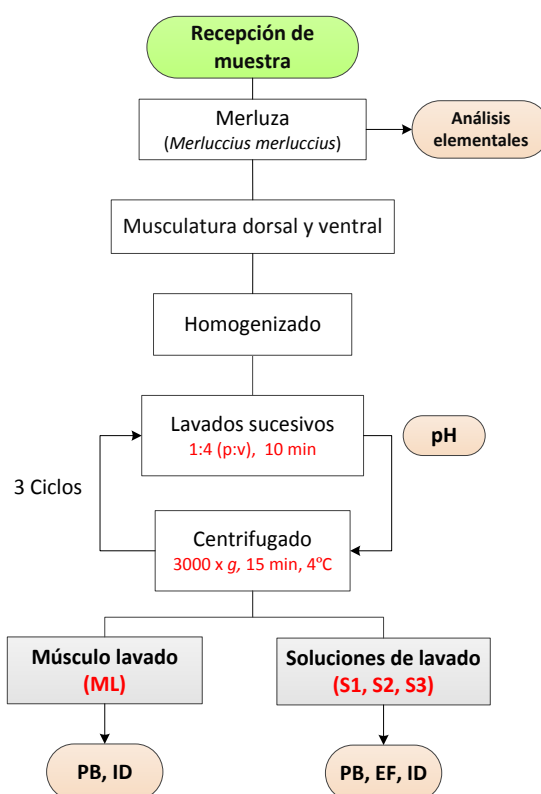
El esquema del experimento se presenta en la Figura 5.25.

5.3.2.1.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Pescado utilizado

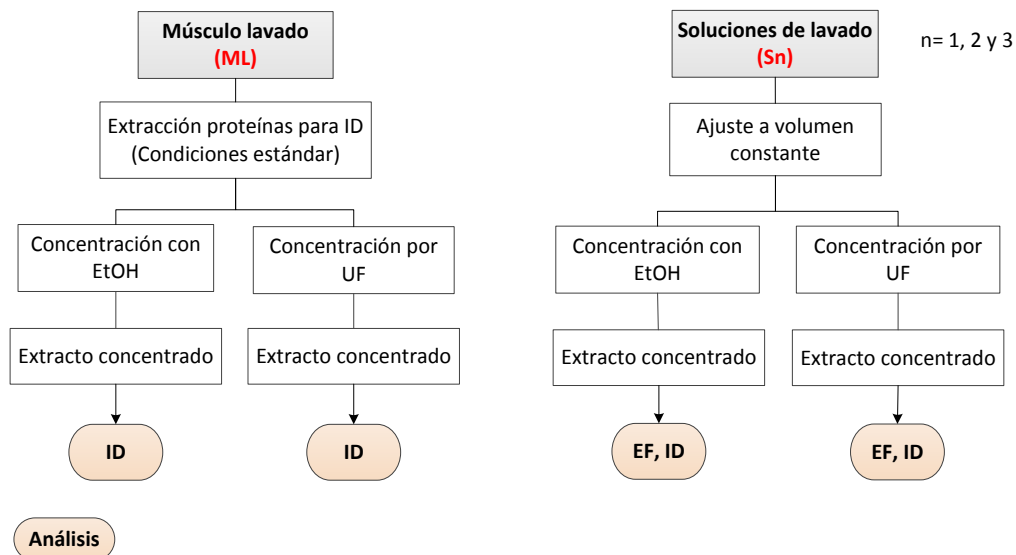
Las merluzas (*Merluccius merluccius*) utilizadas para este experimento fueron capturadas en junio del 2010, procedentes de la zona de pesca VI-FAO 27, recepcionadas en Mercamadrid y posteriormente enviadas al ICTAN. La longitud y el peso de los pescados fueron $44,25 \pm 1,32$ cm y $0,92 \pm 0,02$ kg respectivamente. Se utilizaron 4 merluzas, las cuales fueron descabezadas, evisceradas, quitadas la piel y cortadas en filetes. La temperatura durante la manipulación y conservación de las muestras fue $\leq 5^{\circ}\text{C}$.

Se siguió el Protocolo de recepción de muestra descrito en el Apartado 3.1.



Concentración de los extractos

Extractos para ID de ML y Aguas de lavado (S1, S2 y S3)



PB: Proteína bruta
EF: Electroforesis
ID: Inmunodetección

Figura 5.25 Esquema del estudio de lavados sucesivos tipo surimi de músculo de merluza con infestación natural y concentración de los extractos para inmunodetección con etanol (EtOH) y ultrafiltración (UF).

Preparación de la muestra

Debido a la baja tasa de infestación natural (≤ 5 larvas/100 g músculo) del músculo dorsal, se utilizaron las musculaturas ventrales del lote de merluzas recepcionado, que previamente fueron envasadas a vacío, congeladas y almacenados a $-30\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante 48 horas. Se utilizaron 4 músculos ventrales (2 izquierdos y 2 derechos) previamente descongelados y con un peso total de 200 g.

El procedimiento seguido se realizó en condiciones de laboratorio por triplicado y se describe a continuación.

En una batidora-picadora (Hand processor accesory, Minipimer 5, Braun GmbH, Alemania) se obtuvo una mezcla homogénea de músculo y músculo ventral, la cual fue sometida a 3 lavados sucesivos manteniendo una relación entre músculo-solución de lavado (BF-Na: Buffer fosfato pH 7,5) de 1:4 (p:v) (Matsumoto y Noguchi, 1992; Hultin *et al.*, 2005; Carbajal *et al.*, 2005). Cada lavado tuvo una duración de 10 minutos, con agitación constante, se verificó que el pH de la mezcla estuviese comprendido entre 7 y 7,5 y que la temperatura no excediera los 5°C .

Para separar el músculo de la solución de lavado, se centrifugó (Centrífuga Heraeus Multifuge 3L-R, Kendro Laboratory Products, Alemania) a $3000 \times g$ durante 15 minutos a 4°C . El músculo obtenido después 3° lavado (ML) y las soluciones de lavado obtenidas (S1, S2 y S3) se reservaron en nevera en refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) para los análisis correspondientes. Con la finalidad de verificar y comparar la cantidad de proteínas eliminadas en cada lavado, cada solución de lavado se ajustó a volumen constante con buffer fosfato (BF-Na).

- Concentración con etanol (EtOH)

Se realizó por componentes del Sub-proyecto 3 a partir de las aguas de lavado obtenidas en nuestro Departamento (ICTAN).

De cada solución de lavado ajustada se tomó una alícuota de 1 mL, se mezcló con 9 mL de etanol absoluto y se mantuvo en reposo durante 15 minutos a temperatura

ambiente ($\leq 20^{\circ}\text{C}$). Luego se centrifugó durante 15 minutos a $3000 \times g$ y 20°C . Se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en $100 \mu\text{L}$ de tampón de muestra de electroforesis para inmunodetección por WB (Apartado 3.2.6.3.3).

- ***Concentración por ultrafiltración (UF)***

Se tomó una alícuota de 10 mL de muestra y se concentró hasta 1,5 mL. La separación de proteínas se realizó por filtración y centrifugación utilizando amicones de 50 mL de capacidad y cuyo tamaño de exclusión fue de 3 kDa (Amicon Ultra-4, Millipore, Billerica, Massachusetts, USA). La centrifugación (Centrífuga Heraeus Multifuge 3L-R) se realizó a $3000 \times g$ durante 20 minutos a 5°C . El sobrenadante se descartó y el volumen de muestra retenida en el filtro se traspasó a un tubo eppendorf y se congeló a $-20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para su posterior análisis por inmunodetección.

5.3.2.1.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

Proteína bruta

Se determinó proteína bruta (Apartado 3.2.2.2) del músculo infestado (MP), músculo obtenido después del 3° lavado (ML) y soluciones de lavado (S1, S2 y S3). Los resultados se expresan en porcentaje (%) respecto al músculo inicial.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (Apartado 3.2.3.3) en las aguas de lavado sin concentrar y concentradas.

Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

La inmunodetección por WB (Apartado 3.2.6.2) se realizó en músculo obtenido después del 3° lavado (ML) y soluciones de lavado (S1, S2 y S3) sin concentrar y concentradas.

5.3.2.1.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado se describe en el Apartado 3.3.

5.3.2.1.3 Resultados y discusión

5.3.2.1.3.1 Evaluación de las modificaciones de las proteínas del músculo de pescado

El contenido de humedad de ML fue 88% y aunque se trabajó en un rango de pH de 7-7,5 hay que tener en cuenta que durante los lavados y dependiendo del pH de la solución, la proteína puede hidratarse modificando su extracción.

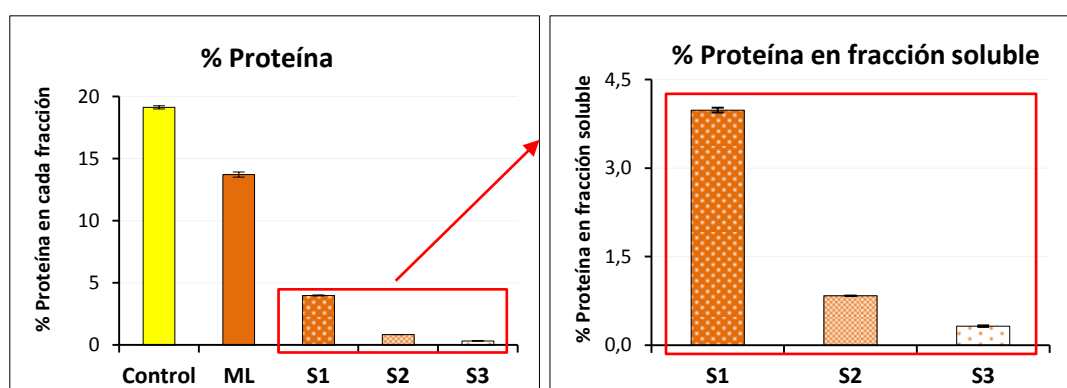


Figura 5.26 Porcentaje de proteína (%) respecto al músculo inicial en músculo de merluza con infestación natural sometido a lavados sucesivos. **Control:** Músculo infestado sin tratamiento; **ML:** Músculo después del 3º lavado con buffer fosfato pH 7,5 (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$); **S1:** Solución del 1º lavado; **S2:** Solución del 2º lavado; **S3:** Solución del 3º lavado.

La Figura 5.26 muestra la cantidad de proteína extraída en los lavados sucesivos con buffer fosfato. En el músculo lavado (ML) se evidencia una disminución de proteína con respecto al músculo control sin tratamiento (MP). En las soluciones de lavado la cantidad de proteína extraída disminuye con el número de lavados, comportamiento que ha sido reportado en merluza almacenada en congelación durante 12 meses en condiciones similares de tratamiento (Tejada *et al.*, 2003b).

Aunque algunos autores consideran que aproximadamente el 50% de los componentes solubles se extraen en el primer ciclo de lavado, la extracción dependerá

de factores como la especie, la frescura del músculo o el pH durante el lavado (Yamamoto, 1974; Morrissey *et al.*, 2005). En nuestro caso la proteína en S1 representó el 77% de la cantidad total de proteína total extraída durante la operación de lavado.

En la Figura 5.27 se presenta el patrón electroforético de las soluciones de lavado sin concentrar y concentradas por EtOH y UF. En las muestras sin concentrar se detectaron las mismas bandas en las 3 soluciones aunque las correspondientes al primer lavado (S1) son más intensas que las correspondientes a los lavados sucesivos (S2 > S3), lo que se corresponde con la menor concentración de proteína en estas muestras (Figura 5.26). La disminución de bandas en las soluciones de lavado se observaron claramente en la zona de 17-24 kDa y 38-52 kDa.

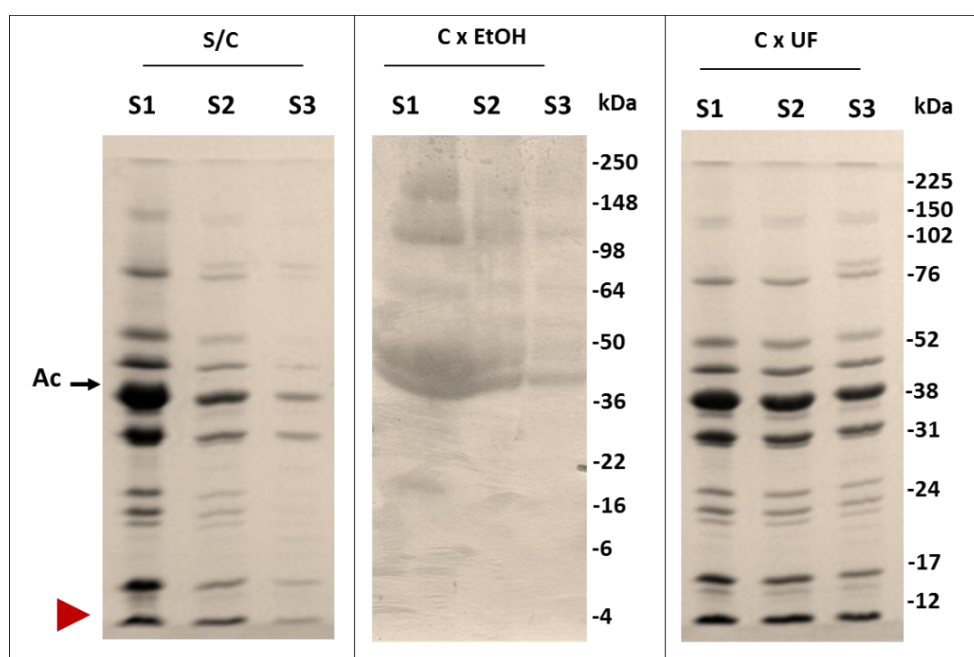


Figura 5.27 Patrón de electroforesis de las soluciones de lavado. **S/C**: Sin concentrar; **CxEtOH**: Concentración con etanol (1:9, v:v); **CxUF**: Concentración por ultrafiltración (10 a 1,5 mL); **S1**: Solución del 1º lavado; **S2**: Solución del 2º lavado; **S3**: Solución del 3º lavado; **Ac**: Actina; **▶**: Banda correspondiente al PM de Anis 4.

En la concentración de las soluciones de lavado con EtOH, se observó la agregación de proteínas a nivel de 36 y 50 kDa, así como la pérdida de las bandas correspondientes al PM de Ani s 4 (9 kDa). Mientras que con la concentración por UF fue posible identificar el tipo de proteínas eliminadas tras los lavados sucesivos, así como verificar que al concentrar nos encontramos por encima del límite de detección de la técnica de inmunodetección.

Ani s 4, con un peso molecular alrededor de 9 kDa y punto isoelectrico de 5,57 es considerada una proteína alergénica de gran valor diagnóstico debido a su gran estabilidad térmica y resistencia en condiciones de extrema acidez (Moneo *et al.*, 2000a; Rodríguez-Mahillo, 2006). Al solubilizar la proteína a un valor de pH superior al punto isoelectrico de Ani s 4, se pretende eliminar esta proteína del músculo en la etapa de lavado en la elaboración de surimi. Al concentrar las fracciones solubles por UF, encontramos proteínas a nivel del PM de Ani s 4, aunque no sean necesariamente alergénicas.

5.3.2.1.3.2 Inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

En la Figura 5.28 se presenta la inmunodetección por WB revelada con antígenos de Ani s 4. Se comprobó la presencia de este alérgeno en el músculo lavado (ML) entre las bandas de 10 y 12 kDa, aunque con mayor intensidad en los extractos concentrados con etanol y UF.

En las soluciones de lavado sin concentrar y en las concentradas con etanol (EtOH), las bandas correspondientes a Ani s 4 fueron imperceptibles, probablemente debido a su baja concentración. Únicamente en las soluciones de lavado concentradas por UF se detectaron las bandas correspondientes a Ani s 4 (9 kDa) e inclusive se evidenció un incremento al concentrar la proteína extraída en los lavados sucesivos.

Uno de los problemas observados en la concentración con EtOH fue la pérdida de bandas en las soluciones de lavado probablemente debido a la deshidratación o

desnaturalización y agregación de las proteínas durante la precipitación. Por esta razón se descartó esta técnica de concentración.

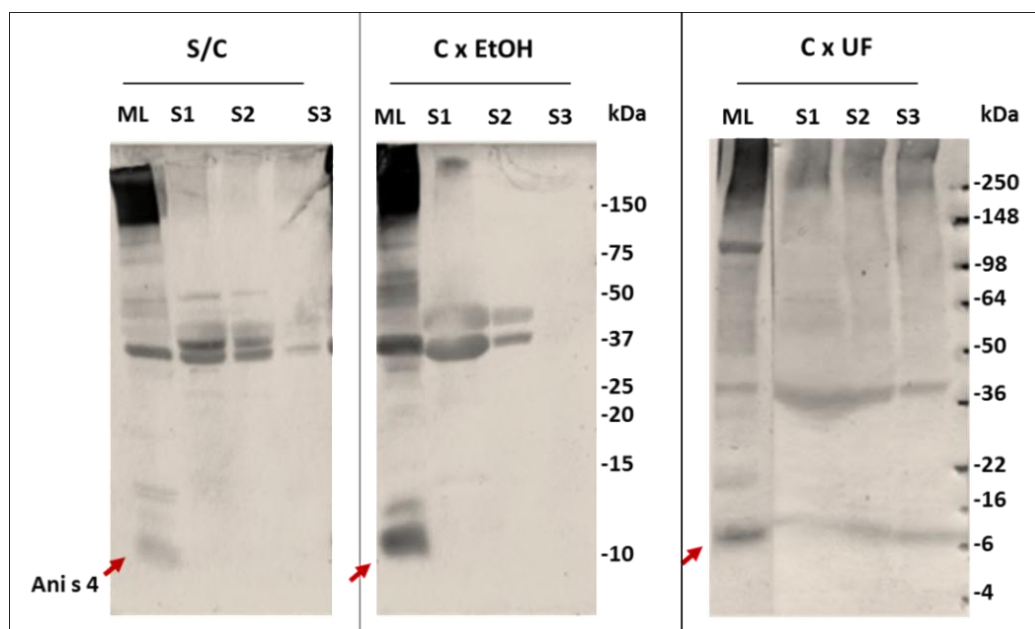


Figura 5.28 Inmunodetección revelada con antígenos de Ani s 4 del músculo lavado y soluciones de lavado obtenidas de merluza infestada naturalmente. **ML**: Músculo después del 3° lavado con buffer fosfato pH 7,5 (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$); **S1**: Solución del 1° lavado; **S2**: Solución del 2° lavado; **S3**: Solución del 3° lavado; **S/C**: Sin concentrar; **CxEtOH**: Concentración con etanol (1:9, v:v); **CxUF**: Concentración por ultrafiltración (10 a 1,5 mL).

Durante la aplicación de la concentración por UF también se encontraron algunas dificultades. Por ejemplo se observó que dependiendo del tipo de muestra el tiempo de centrifugación era variable, lo que significó concentrar las muestras con diferentes condiciones, inconveniente que al extrapolarse a lotes con mayor número de muestras y con mayor cantidad de proteína, se tradujo en un mayor tiempo en el análisis al saturarse el filtro y originando posibles errores en la concentración.

Se verificó la validez de las técnicas de concentración utilizadas por UF para las condiciones de tratamiento aplicadas. Para evitar los posibles problemas de concentración o poca visibilidad de las bandas en los geles de WB al utilizar muestras con distinta concentración de antígenos, se decidió utilizar la técnica de Dot blot (DB) para la cuantificación de la respuesta antigénica, y de esta forma lograr una mejor evaluación y análisis comparativo de los resultados finales.

En general, los resultados obtenidos en los estudios preliminares evidencian que a pesar que la cantidad de proteína en las fracciones S2 y S3 disminuye, se sigue detectando la presencia de Ani s 4 en el músculo después del 3° lavado, lo que nos indica su eliminación durante el proceso de elaboración de surimi.

5.3.2.2 Lavados sucesivos tipo surimi y selección de soluciones de lavado

Como se ha indicado en el Apartado anterior, uno de los factores que determina la eficacia de la etapa de lavado es el pH debido a que influye en la capacidad de retención de agua del músculo y en consecuencia en las características de los geles elaborados con el surimi producido (Borderías y Tejada, 1987).

Las proteínas aumentan su hidratación cuando se encuentran a pH distintos al PI, debido a la repulsión entre moléculas de proteínas y la mayor interacción con el agua (Kuntz, 1971; Hamm, 1986). La presencia de sales en el medio también puede modificar este comportamiento debido a que los iones interaccionan con los grupos cargados de las proteínas (Kinsella, 1982; Fennema, 1985; Huidobro y Tejada, 1993). Sin embargo, el efecto de las sales depende de su carácter aniónico o catiónico así como del tamaño de su radio de hidratación (Fennema, 1985).

Una forma de evitar una mayor retención de agua en el músculo es lavar a un pH cercano al punto isoeléctrico de las proteínas miofibrilares (4,5-5,5), sin embargo, es necesario tener en cuenta que a pH inferiores a 6,3 la funcionalidad de estas proteínas disminuye considerablemente (Nishioka, 1984). En tal sentido, para lograr una mejor capacidad funcional del surimi se recomienda mantener el pH entre 6,5 y 7,5 durante la etapa de lavado (Okada, 1981; Park y Lin, 2005). Asimismo, este pH (6,5-7,5) se corresponde con el PI de algunas proteínas alergénicas de *Anisakis*, lo que representaría una mayor retención en el músculo.

La mejora de las propiedades de gel de surimi se ha logrado por diversos medios, tales como la adición de aditivos de proteínas, el tratamiento térmico apropiado e inclusive las condiciones de lavado (pH y soluciones de lavado) aplicadas en la etapa de obtención del surimi (Park y Morrissey, 2000).

Se ha establecido que el uso de agentes oxidantes, como hipoclorito de sodio (NaClO) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), en la etapa del lavado pueden mejorar la capacidad de formación de gel, en especial en pescado de baja calidad. Al respecto se ha demostrado que la presencia de agentes oxidantes inducen la oxidación de

proteínas, a través de la formación de enlaces disulfuro, lo que conlleva a que fragmentos de las proteínas musculares degradadas se entrecrucen y formen grandes agregados proteicos mejorando la capacidad de gelificación (Liu y Xiong, 2000; Phatcharat *et al.*, 2006).

Por otro lado, el uso de soluciones de cloruro de sodio (NaCl) y bicarbonato de sodio (NaHCO₃) durante la etapa de lavado ayudan a la solubilización de la proteína miofibrilar (Suzuki, 1981), así como a extraer lípidos, proteína sarcoplásmica y otros compuestos que puedan afectar en el proceso de formación de gel (Shimizu, 1965; Borderías y Tejada, 1987) de ahí que por lo general son utilizadas para la fabricación de surimi a partir de especies pelágicas (Hultin *et al.*, 2005).

En esta parte de los estudios preliminares de lavado (Etapa II del proceso general de obtención de surimi y geles) se ha considerado utilizar las propiedades de diferentes soluciones de lavado, a fin de modificar la estructura de las proteínas alergénicas o simplemente favorecer la pérdida de su actividad alergénica por formación de enlaces con otras proteínas del entorno. En la etapa de lavado se evaluó fundamentalmente la mayor extracción-detección de alérgenos en las soluciones de lavado y la detección en el músculo procesado.

5.3.2.2.1 Objetivo

El objetivo de esta parte del estudio fue evaluar la eliminación de los alérgenos de *Anisakis* en músculo infestado artificialmente sometido a lavados sucesivos con diferentes soluciones de lavado, teniendo en consideración el pH de las soluciones utilizadas, así como los puntos isoeléctricos de los principales alérgenos descritos de *Anisakis* a fin de poder extraerlos y detectarlos en el agua de lavado y/o músculo lavado según corresponda. Se aplicó la metodología basada en la obtención de surimi por método tradicional japonés (Suzuki, 1981).

5.3.2.2.2 Diseño del experimento

El esquema del experimento se presenta en la Figura 5.29.

5.3.2.2.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Larvas de *Anisakis* spp.

Las larvas vivas de *Anisakis* (L3) fueron obtenidas de ovarios y/o vísceras de merluzas (*Merluccius merluccius*) enviadas por CETPEC junto con el lote de merluzas que se describe posteriormente. Se utilizó aproximadamente un total de 100 g de larvas incluyendo tejidos de vísceras que fueron almacenadas en refrigeración ($5\pm1^{\circ}\text{C}$) hasta su uso.

Se prepararon larvas para los estudios de identificación taxonómica. El protocolo se describe en el Apartado 3.2.1.

Pescado utilizado

Las merluzas fueron capturadas en la zona de Pesca VIIj-FAO 27, en febrero del 2011 y enviadas al ICTAN desde Puerto de Celeiro por CETPEC. Se seleccionaron merluzas por su alto valor económico y la alta prevalencia e intensidad de infestación por *Anisakis*. La longitud y el peso promedio de los pescados fueron $67,90\pm3,70$ cm y $1,83\pm0,35$ kg respectivamente. Se recibieron 10 merluzas, las cuales fueron conservadas en cámara de refrigeración ($5\pm1^{\circ}\text{C}$) hasta su posterior uso.

Se siguió el Protocolo de recepción de muestra descrito en el Apartado 3.1.

Preparación de la muestra

El procedimiento seguido se realizó en laboratorio por triplicado y se describe a continuación.

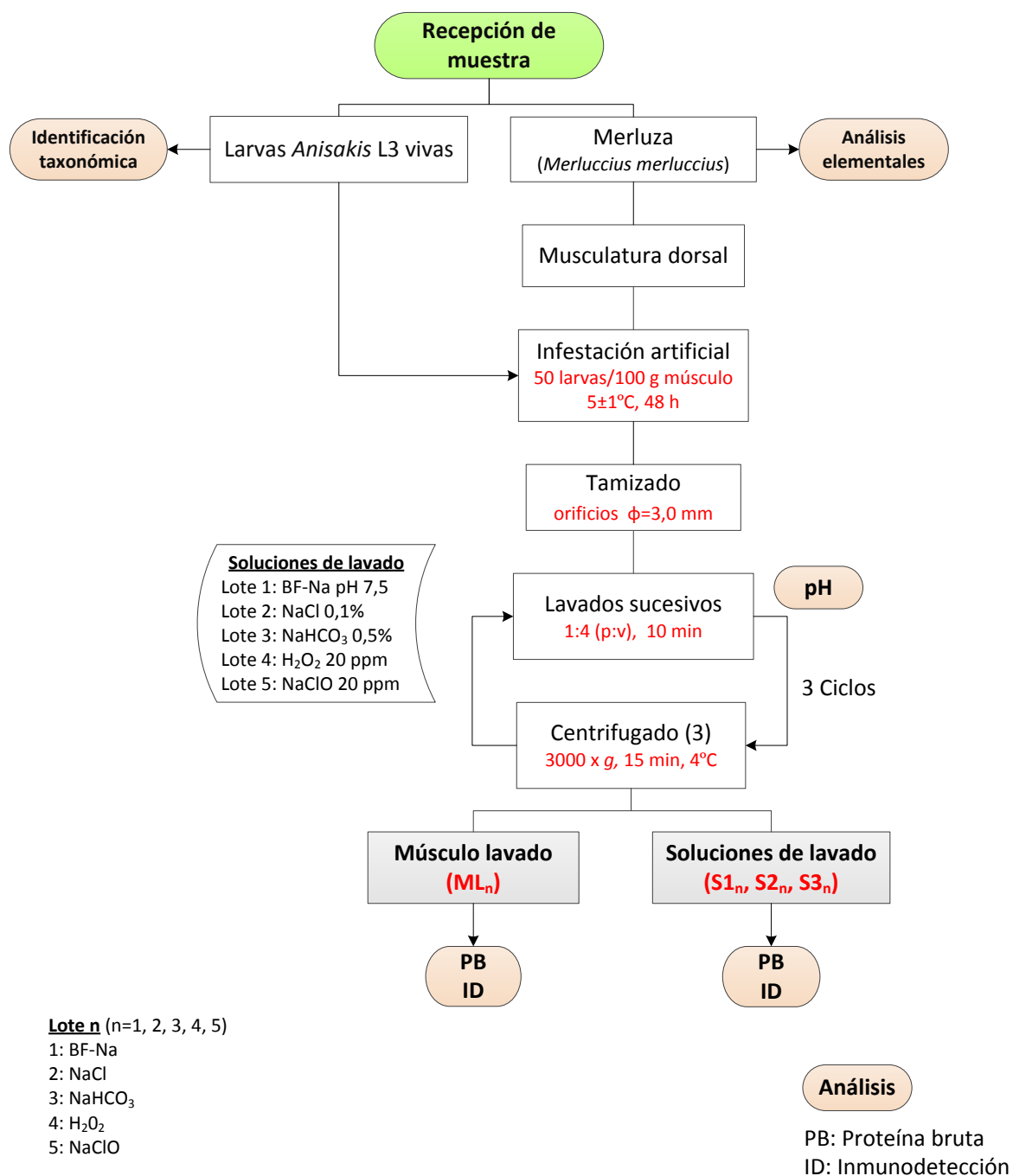


Figura 5.29 Esquema de lavados sucesivos de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) con distintas soluciones de lavados.

Los filetes fueron infestados artificialmente con lavas vivas L3 de *Anisakis* en una proporción de 50 larvas por cada 100 g de músculo. Para facilitar la penetración de las larvas en el músculo los filetes se mantuvieron en refrigeración ($5\pm 1^\circ\text{C}$) durante 48 horas y luego para producir la muerte de las larvas se congelaron a $-20\pm 2^\circ\text{C}$ durante 4 días. En base a estudios previos (Apartado 5.3.2) se utilizó una tasa de infestación elevada con el fin de evaluar los resultados comparativamente y para favorecer la detección de alérgenos por encima de su umbral de detección de la técnica.

Una vez descongelada la muestra, en una batidora-picadora (Hand processor accesory, Minipimer 5, Braun GmbH, Alemania) se obtuvo una mezcla homogénea de músculo y con la ayuda de un molino de alimentos (OXO Good Grips, UK) el músculo fue pasado a través de un tamiz con 3,0 mm de diámetro de orificio. Esta operación simuló la etapa de tamizado realizada en el proceso industrial de elaboración de surimi.

El músculo tamizado fue sometido a 3 lavados sucesivos manteniendo una relación entre músculo-solución de lavado de 1:4 (p:v). Para los lavados se seleccionaron 5 soluciones con diferentes pH y se aplicaron las condiciones de lavado descritas en los estudios preliminares (Apartado 5.3.2.3). No se ajustó el pH a los valores recomendados (7-7,5) ya que el objetivo era evaluar el efecto de distintos pH en la eliminación de alérgenos.

Lote n (n=1, 2, 3, 4, 5)

Lote 1: *BF-Na*, Buffer fosfato sódico, pH 7,5

Lote 2: *NaCl*, Cloruro sódico 0,1%, pH 7,0

Lote 3: *NaHCO₃*, Bicarbonato sódico 0,5%, pH 8,5

Lote 4: *H₂O₂*, Peróxido de hidrógeno 20 ppm, pH 6

Lote 5: *NaClO*, Hipoclorito sódico 20 ppm, pH 6,5

Todos los músculos lavados (ML) y aguas de lavado (S1, S2 y S3) obtenidos fueron reservados en refrigeración ($5\pm 1^\circ\text{C}$) para los análisis correspondientes.

5.3.2.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

Se siguió el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

Análisis elementales y pH

Se realizaron los análisis elementales y pH del músculo inicial, según protocolo descrito en el Apartado 3.2.2.

Adicionalmente se determinó el porcentaje de humedad (Apartado 3.2.2.1), proteína bruta (Apartado 3.2.2.2) y se midió el pH (Apartado 3.2.2.5) del músculo infestado sin tratamiento (MP), músculos obtenidos después del 3º lavado (ML) y soluciones de lavado durante todo el proceso (S1, S2, S3).

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida (Apartado 3.2.3.3) de las soluciones de lavado obtenidas (S1, S2 y S3).

Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

La inmunodetección por Dot blot (DB) se realizó en los ML y soluciones de lavado correspondientes (S1, S2 y S3) (Apartado 3.2.6.2).

5.3.2.2.3 Análisis estadístico

En el Apartado 3.3 se describe el procedimiento seguido para el análisis estadístico.

5.3.2.2.3 Resultados y discusión

5.3.2.2.3.1 Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis*

Morfológicamente las larvas fueron clasificadas como tipo I y se encontraron especies de *Anisakis simplex* s.s. (97.15%) e híbridos de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*

(2,86%). La presencia de híbridos también ha sido descrita por Abattouy (2012) quien reporta en estornino (*Scomber japonicus*) un 16,4% de genotipos híbridos de *A. simplex* s.s. y *A. pegreffii*.

5.3.2.2.3.2 Análisis elementales del músculo inicial

El contenido de humedad ($805,36 \pm 2,31 \text{ g kg}^{-1}$), proteína ($191,17 \pm 1,30 \text{ g kg}^{-1}$), cenizas ($13,08 \pm 0,08 \text{ g kg}^{-1}$) y grasa ($8,15 \pm 0,10 \text{ g kg}^{-1}$) del músculo de merluza se encuentran dentro de los valores reportados para esa especie (Tejada *et al.*, 2003a).

5.3.2.2.3.3 Evaluación de las modificaciones en la composición del músculo tamizado

El rendimiento del músculo después del tamizado fue del 70%, aunque es inferior al porcentaje obtenido en el experimento descrito en el Apartado 5.3.1, en ambos casos se encontró la presencia de larvas vivas en el tamiz, en el residuo y en el músculo tamizado (Figura 5.30).

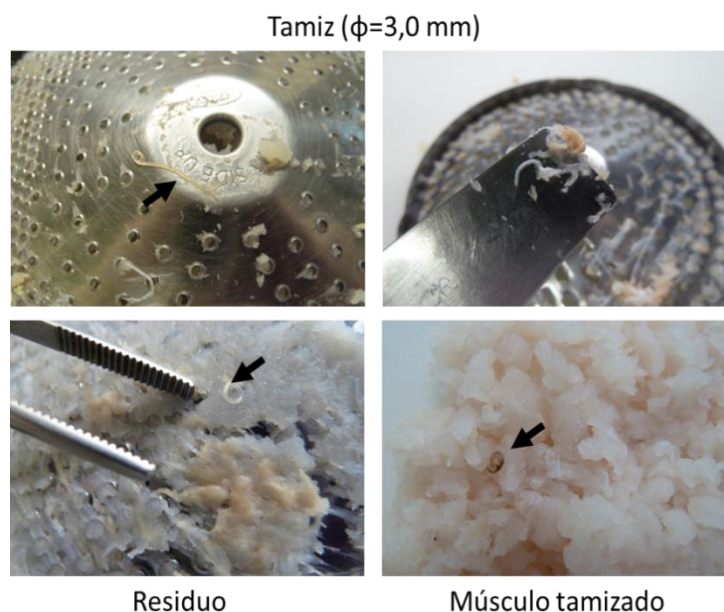


Figura 5.30 Larvas de *Anisakis* spp. encontradas durante la simulación de la operación de tamizado (diámetro de orificio 3,0 mm) de músculo de merluza con infestación artificial (50 larvas/100 g músculo). Las flechas señalan ejemplos de larvas encontradas.

Tabla 5.7 Porcentaje (%) de humedad y proteína y pH de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) y de las diferentes fracciones obtenidas en los lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$) con diferentes soluciones.

Lote		Humedad (%)	Proteína (%)	pH
Control	MP	$79,70 \pm 0,78^a$	$19,18 \pm 0,10^a$	$7,20 \pm 0,02^a$
	ML	$88,14 \pm 0,14^b$	$13,83 \pm 0,12^b$	$7,46 \pm 0,02^b$
	S1		$3,92 \pm 0,03^{a/x}$	$7,34 \pm 0,01^{a/x}$
	S2		$0,93 \pm 0,02^{a/y}$	$7,47 \pm 0,04^{b/y}$
Lote 1	S3		$0,29 \pm 0,02^{a/z}$	$7,48 \pm 0,02^{b/y}$
	ML	$87,85 \pm 0,16^b$	$14,00 \pm 0,06^b$	$7,10 \pm 0,05^a$
	S1		$3,67 \pm 0,01^{b/x}$	$7,19 \pm 0,06^{a/x}$
	S2		$0,82 \pm 0,01^{b/y}$	$7,18 \pm 0,02^{a/x}$
Lote 2	S3		$0,23 \pm 0,04^{a/z}$	$7,19 \pm 0,01^{a/x}$
	ML	$87,58 \pm 0,14^b$	$13,53 \pm 0,04^c$	$8,40 \pm 0,02^d$
	S1		$4,10 \pm 0,01^{c/x}$	$7,70 \pm 0,01^{c/x}$
	S2		$0,87 \pm 0,02^{b/y}$	$8,19 \pm 0,02^{c/y}$
Lote 3	S3		$0,21 \pm 0,03^{a/z}$	$8,41 \pm 0,01^{c/z}$
	ML	$88,97 \pm 0,17^c$	$12,53 \pm 1,06^c$	$7,40 \pm 0,03^b$
	S1		$3,86 \pm 0,03^{a/x}$	$7,26 \pm 0,01^{a/x}$
	S2		$0,85 \pm 0,01^{b/y}$	$7,46 \pm 0,02^{b/y}$
Lote 4	S3		$0,38 \pm 0,01^{b/z}$	$7,41 \pm 0,04^{b/y}$
	ML	$88,03 \pm 0,18^b$	$14,54 \pm 0,18^d$	$7,62 \pm 0,04^d$
	S1		$3,80 \pm 0,02^{a/x}$	$7,28 \pm 0,01^{a/x}$
	S2		$0,75 \pm 0,06^{b/y}$	$7,46 \pm 0,02^{b/y}$
Lote 5	S3		$0,41 \pm 0,05^{b/z}$	$7,65 \pm 0,02^{c/z}$

MP: Músculo infestado sin tratamiento (Control); **ML:** Músculo obtenido después del 3º lavado; **S1:** Solución del 1º lavado; **S2:** Solución del 2º lavado; **S3:** Solución del 3º lavado; **Lote 1:** BF-Na pH 7,5; **Lote 2:** NaCl 0,1%; **Lote 3:** NaHCO₃ 0,5%; **Lote 4:** H₂O₂ 20 ppm; **Lote 5:** NaClO 20 ppm. Letras diferentes (a, b, c...) en la misma columna significan diferencias entre lotes pertenecientes a una misma fracción ($p < 0,05$). Letras diferentes (x, y, z) en la misma columna significan diferencias entre fracciones solubles Sn en el mismo lote ($p < 0,05$).

En la Tabla 5.7 se presentan el porcentaje de humedad y proteína y valores de pH de músculo de merluza infestado artificialmente y de las distintas fracciones obtenidas en los 3 lavados sucesivos con diferentes soluciones.

El contenido de humedad en los músculos obtenidos después del 3° lavado (ML) osciló entre 87 y 89%, y se evidenciaron diferencias significativas respecto al músculo control sin tratamiento (MP) debido a la absorción de agua a lo largo de los lavados sucesivos a los que fueron sometidos. Entre lotes, el ML del lote 4 (H₂O₂) presentó una retención de agua significativamente mayor respecto a los músculos lavados de los otros lotes.

El porcentaje de proteína durante la etapa de lavados siguió la misma pauta que la observada en trabajos preliminares (Apartado 5.3.2.1). En todos los lotes se observó una disminución significativa del contenido de proteína en el músculo lavado (ML) respecto al músculo control (MP). Las diferencias significativas en el contenido de proteína de los ML estuvieron en función de la solución de lavado utilizada. El ML del lote 5 (NaClO) presentó un contenido de proteína significativamente superior respecto a los músculos lavados con las otras soluciones.

Durante los lavados, la mayor cantidad de proteína se extrajo en el agua del primer lavado (S1) y dependiendo del lote las diferencias fueron significativas. En el lote 3 (NaHCO₃) el alto contenido de proteína obtenida en el primer lavado (S1) sugiere una mayor solubilización de la proteína respecto a los correspondientes S1 de los otros lotes, y en ese caso la diferencia fue significativa.

Para el resto de lavados (S2 y S3) la cantidad de proteína disminuyó en todos los lotes. En la fracción S2 sólo se encontraron diferencias significativas con el S2 del lote 2 (BF-Na), mientras que en el último lavado los mayores contenidos de proteína los presentaron los S3 de los lotes 4 y 5 (H₂O₂ y NaClO). El mayor porcentaje de proteína en las fracciones solubles (S1, S2 y S3) se obtuvo en el lote 3 (NaHCO₃) y coincidió con un elevado valor de pH durante los lavados.

El pH de los músculos lavados (ML) varió en función al tipo de solución de utilizada (Tabla 5.7). En la mayoría de los tratamientos los pH se mantuvieron por debajo de 7,5 con excepción del músculo lavado del lote 3 (NaHCO_3) en donde se obtuvo un valor de pH superior a 8 a partir del segundo lavado. Los valores de pH durante los lavados se corresponden con el pH de las soluciones utilizadas, aunque en los lotes 4 y 5 (H_2O_2 y NaClO) se observó un efecto tampón del músculo.

El estudio electroforético de las soluciones de lavado, sin ajuste de la concentración de proteína coincidió con el contenido de proteína observado en los diferentes lotes, tal como se observa en la Figura 5.31.

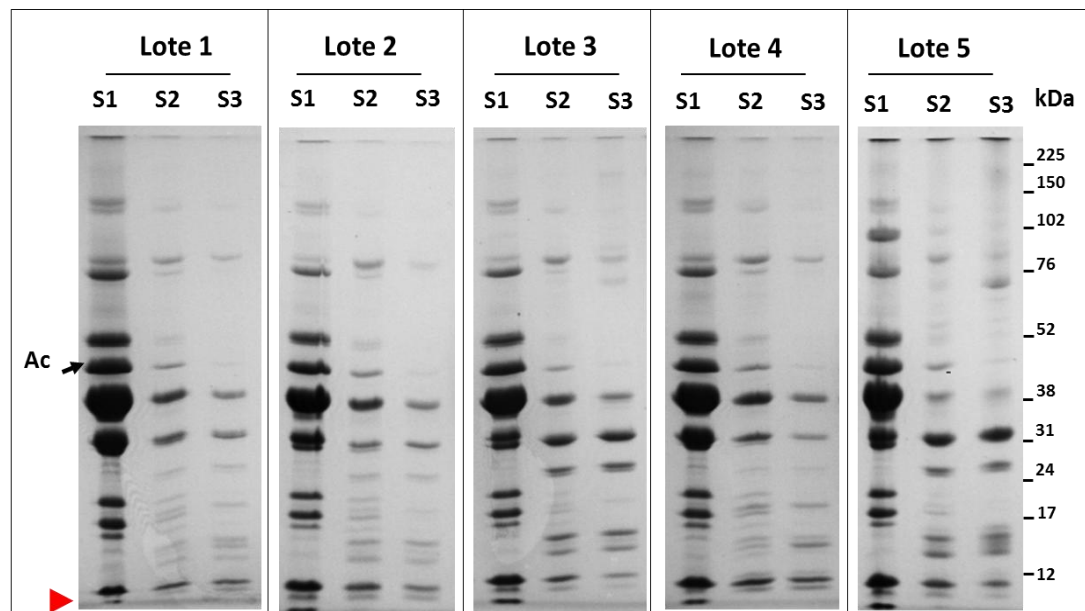


Figura 5.31 Patrón de electroforesis de las soluciones de lavado obtenidas de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) sometido a lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^\circ\text{C}$) con diferentes soluciones de lavado. **Lote 1:** BF-Na pH 7,5; **Lote 2:** NaCl 0,1%; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5%; **Lote 4:** H_2O_2 20 ppm; **Lote 5:** NaClO 20 ppm; **S1:** Solución del 1º lavado; **S2:** Solución del 2º lavado; **S3:** Solución del 3º lavado; **Ac:** Actina; **▶**: Banda correspondiente al PM de Anis 4.

En las fracciones S1 de todos los lotes se evidenció la presencia de proteína de PM inferiores a 12 kDa, mientras que en las fracciones S2 y S3 de los lotes 3 y 5 (NaHCO₃ y NaClO) se observó la formación de una banda entre 24 y 31 kDa y bandas de mayor intensidad entre 12 y 17 kDa. Algunas de las proteínas alergénicas de *Anisakis* se encuentran dentro de ese rango de PM lo que podría indicar que se están eliminando durante los lavados sucesivos.

Con respecto a las bandas correspondientes al peso molecular de Ani s 4 (9 kDa), en esta etapa del estudio no se encontraron mayores diferencias entre lotes, aunque en todas las soluciones de lavado (S1, S2 y S3) se logró detectar la banda correspondiente al PM de Ani s 4.

Por otro lado, en las muestras lavadas del lote 4 (H₂O₂) se observaron que luego del tercer lavado (S3) el músculo adquirió una consistencia gelatinosa, sugiriéndonos una posible solubilización de proteínas miofibrilares (Niwa, 1992), lo que impediría posteriormente la formación de geles de buena calidad.

5.3.2.2.3.4 Efecto de las soluciones de lavado en la eliminación de alérgenos

En un inicio se planteó realizar la inmunodetección por WB, pero durante el revelado de los geles se observaron irregularidades en el desarrollo de las bandas electroforéticas, probablemente debido al tipo de ingredientes utilizados en cada tratamiento, a la concentración de cada serie o a algún tipo de interferencia entre proteínas. En tal sentido, para una mejor evaluación se optó por cuantificar la respuesta alergénica con la técnica de DB.

En la Figura 5.32 se presenta la cantidad de antígenos de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* en músculo infestado sometido a lavados sucesivos con diferentes soluciones de lavado.

Inmunodetección de alérgenos

- Ani s 4

En los músculos lavados (ML) no se detectó Ani s 4, mientras que la cantidad detectada en las soluciones de lavado (S1, S2 y S3) fue superior a la obtenida en el músculo infestado sin tratamiento (MP). Este comportamiento nos sugiere que la operación de lavado podría facilitar la extracción de Ani s 4.

LAVADOS (ML, S1, S2 y S3)

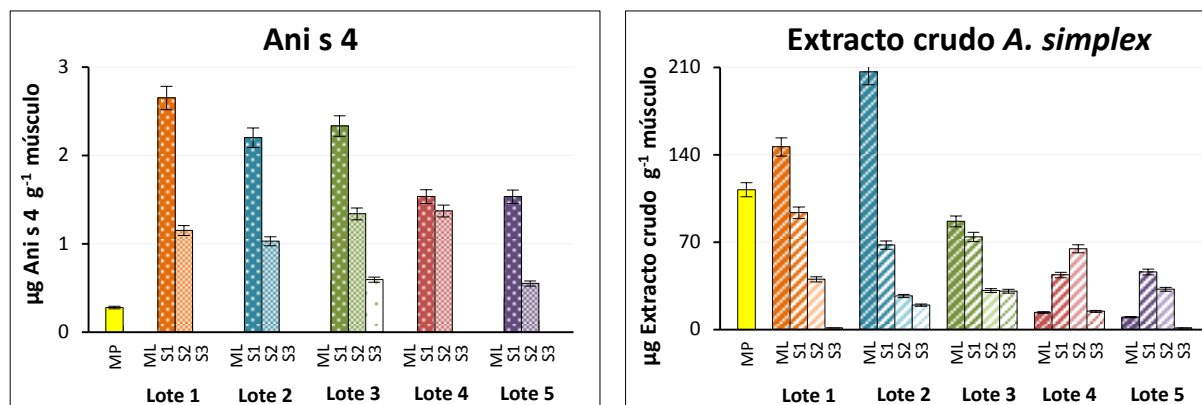


Figura 5.32 Cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de merluza infestado (50 larvas/100 g músculo) sometido a lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^\circ\text{C}$) con diferentes soluciones de lavado. **MP**: Músculo infestado sin tratamiento (muestra control); **ML**: Músculo obtenido después del 3° lavado; **S1**: Solución del 1° lavado; **S2**: Solución del 2° lavado; **S3**: Solución del 3° lavado; **Lote 1**: BF-Na pH 7,5; **Lote 2**: NaCl 0,1%; **Lote 3**: NaHCO_3 0,5%; **Lote 4**: H_2O_2 20 ppm; **Lote 5**: NaClO 20 ppm.

En el primer lavado, la detección de Ani s 4 de la S1 del lote 1 (BF-Na) fue significativamente superior respecto a las correspondientes S1 de los otros lotes. A medida que se continuó lavando (S2) con excepción del lote 4 (H_2O_2), se observó una disminución de Ani s 4 respecto a la detectada en el primer lavado (S1) y la menor

detección la presentó la S2 del lote 5 (NaClO). En el tercer lavado, sólo en la S3 del lote 3 (NaHCO₃) se logró cuantificar Anis 4.

- **Extracto crudo de *A. simplex***

En todos los lotes se evidenciaron diferencias significativas entre músculos lavados (ML) con diferentes soluciones y respecto al control sin tratamiento (MP) y en el caso de los ML de los lotes 1 y 2 (BF-Na y NaCl) la detección de Extracto crudo de *A. simplex* fue superior. Entre lotes, los ML de los lotes 4 y 5 (H₂O₂ y NaClO) fueron los que presentaron la menor detección de antígenos de Extracto crudo de *A. simplex*.

En el primer lavado, el S1 del lote 1 (BF-Na) fue el que alcanzó la mayor detección, encontrándose diferencias significativas respecto al resto de lotes. En el segundo lavado (S2) no se encontraron diferencias significativas entre lotes, excepto en el lote 4 (H₂O₂) cuya detección fue significativamente superior respecto a los S2 de los otros lotes. En el último lavado (S3), sólo se logró detectar Extracto crudo de *A. simplex* en los S3 de los lotes 2, 3 y 4 (NaCl, NaHCO₃ y H₂O₂).

Dependiendo del lote, la detección de alérgenos en las soluciones de lavado presentó una tendencia decreciente a lo largo de los lavados sucesivos y por lo general la mayor detección de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* se observó en el primer lavado (S1), lo que implicaría una mayor eliminación de alérgenos en esa etapa. Sin embargo, en la casi todos los lotes se observó que la cantidad detectada en la sumatoria de las fracciones obtenidas fue superior a la obtenida en el músculo infestado sin tratamiento (MP), sugiriéndonos que de alguna forma el proceso de lavado permite una mayor extracción y detección de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex*, aunque dependerá de las condiciones de lavado aplicadas. Al respecto, se están realizando los estudios pertinentes que permitan modificar el protocolo de extracción.

Con la finalidad de verificar el tipo de proteínas obtenidas en la extracción para ID, se realizó un estudio electroforético de los extractos finales para ID obtenidos de músculo infestado artificialmente sometido a 3 lavados sucesivos, tal como se presenta en la Figura 5.33.

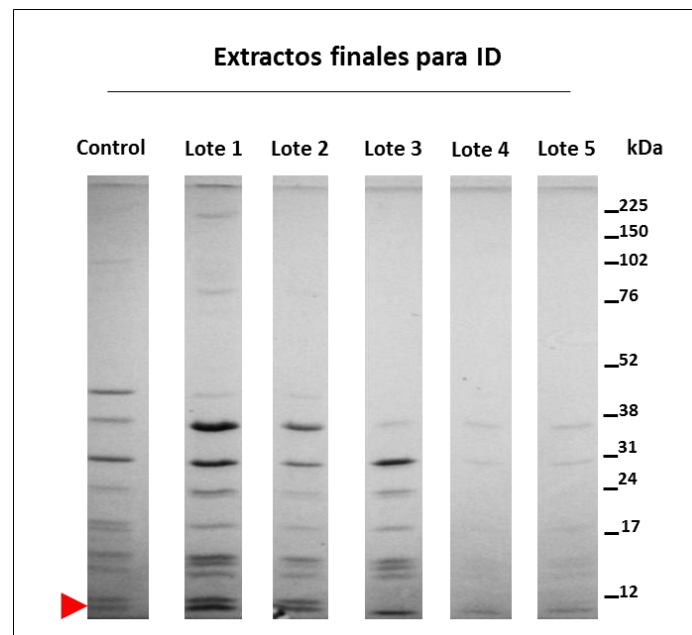


Figura 5.33 Patrón de electroforesis de los extractos finales para inmunodetección (ID) obtenidos de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) sometido a lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$) con diferentes soluciones de lavado. **Control:** Músculo infestado sin tratamiento; **Lote 1:** BF-Na pH 7,5; **Lote 2:** NaCl 0,1%; **Lote 3:** NaHCO₃ 0,5%; **Lote 4:** H₂O₂ 20 ppm; **Lote 5:** NaClO 20 ppm; ▶ : Banda correspondiente al PM de Ani s 4.

En todos los extractos para ID, aunque se observó la banda correspondiente al PM de Ani s 4 (9 kDa) al cuantificar su presencia por DB, no se evidenció una respuesta alérgica, lo que nos sugiere una posible pérdida de alergenidad luego de los lavados sucesivos del músculo.

Asimismo, la baja intensidad de las bandas de los extractos correspondientes a los ML de los lotes 4 y 5 (H_2O_2 y NaClO) respecto al resto de lotes, justifican de alguna manera los resultados obtenidos en el DB al cuantificar Extracto crudo de *A. simplex*. En estos mismos lotes, se observó una pérdida entre las bandas correspondientes entre 24-31 kDa, confirmando que los compuestos correspondientes a este rango de PM fueron eliminados luego de los lavados sucesivos, tal como se observó en el patrón electroforético de las soluciones de lavado (Figura 5.31).

Aunque en las muestras del lote 4 (H_2O_2) también se observó una eliminación de proteínas alergénicas en las soluciones de lavado, tal como se indicó en párrafos anteriores, durante el lavado del músculo se observó que las proteínas gelificaron luego del tercer lavado, lo que nos llevó a descartar esta solución para el estudio final.

Los resultados obtenidos en esta parte del estudio fueron la base del estudio final de surimi geles que se describe posteriormente en el Apartado 5.3.5.

Para la selección de las soluciones de lavado se tuvo en consideración las variaciones de pH durante la etapa de lavado, el punto isoelectrico de los principales alérgenos de *Anisakis* y la cantidad de antígenos detectados en el músculo y en las aguas de lavado. Teniendo en cuenta que en la industria de surimi se utiliza el músculo lavado como materia prima, una menor detección en el músculo correspondería a una mayor eliminación de proteínas alergénicas que se vieron reflejadas en las aguas de lavado.

Dado que el objetivo era reducir o eliminar la mayor cantidad de proteínas alergénicas del músculo y en función a los resultados obtenidos, para el estudio final además del lavado con agua, se seleccionaron como soluciones de lavado BF-Na, NaHCO_3 y NaClO .

5.3.3 Lavados sucesivos en músculo infestado refrigerado y en músculo infestado conservado en congelación

En la etapa de lavado además de eliminar todas las impurezas que puedan proporcionar características sensoriales indeseables en el producto final, se produce una lixiviación de componentes solubles en agua, particularmente proteínas sarcoplásmicas que además de impedir la correcta formación de la red necesaria para la formación del gel, podrían actuar proteolíticamente sobre el músculo. Asimismo, se ha considerado que en esta etapa también se podrían eliminar algunas proteínas alergénicas del músculo infestado y que dependiendo de las condiciones de lavado y la tasa de infestación se lograría una mayor extracción de alérgenos.

Los estudios preliminares realizados nos permitieron establecer las condiciones de lavado necesarias para extraer y detectar alérgenos en músculo lavado y soluciones de lavado (Apartados 5.3.2) y con la finalidad de encontrarnos por encima del límite de detección de la técnica se optó por utilizar una alta tasa de infestación de 50 larvas en 100 g de músculo.

Los alérgenos pueden liberarse al músculo de pescado antes del tratamiento dado, durante el tratamiento o debido a los cambios de permeabilidad o daño en la cutícula por el tratamiento tecnológico. En tal sentido, se ha considerado que la presencia de larvas vivas en el músculo pudiera influir en alguna medida en una alta tasa de detección de alérgenos como consecuencia de la mayor la excreción de proteínas alergénicas en el músculo durante su penetración, o su posible liberación al fragmentarse las larvas durante los tratamientos dados al pescado.

La actividad enzimática de las proteínas alergénicas se ha demostrado en estudios realizados por Solas *et al.* (2008) y aunque se ha establecido que las larvas liberan enzimas alergénicas en su recorrido para penetrar en el músculo, aún no se ha estudiado su comportamiento en músculo infestado con larvas vivas sometido a lavados sucesivos.

5.3.3.1 Objetivo

El objetivo general fue eliminar o disminuir la presencia de alérgenos de *Anisakis* durante el proceso de elaboración de surimi, y en esta parte del proceso (Etapa II del proceso general de obtención de surimi y geles) se plantearon los siguientes objetivos:

- Evaluar el comportamiento de los alérgenos de *Anisakis* en músculo infestado artificialmente con larvas vivas sometido a lavados sucesivos con diferentes soluciones de lavado. Se utilizaron cuatro soluciones para la operación de lavado del músculo.
- Evaluar el efecto de la congelación de músculo infestado artificialmente en la extracción y detección de alérgenos de *Anisakis* durante la operación de lavados sucesivos para la obtención de surimi.

5.3.3.2 Diseño del experimento

En la Figura 5.34 se presentan el esquema general de la etapa de lavado mientras que en la Figura 5.35 se presentan algunas imágenes del proceso.

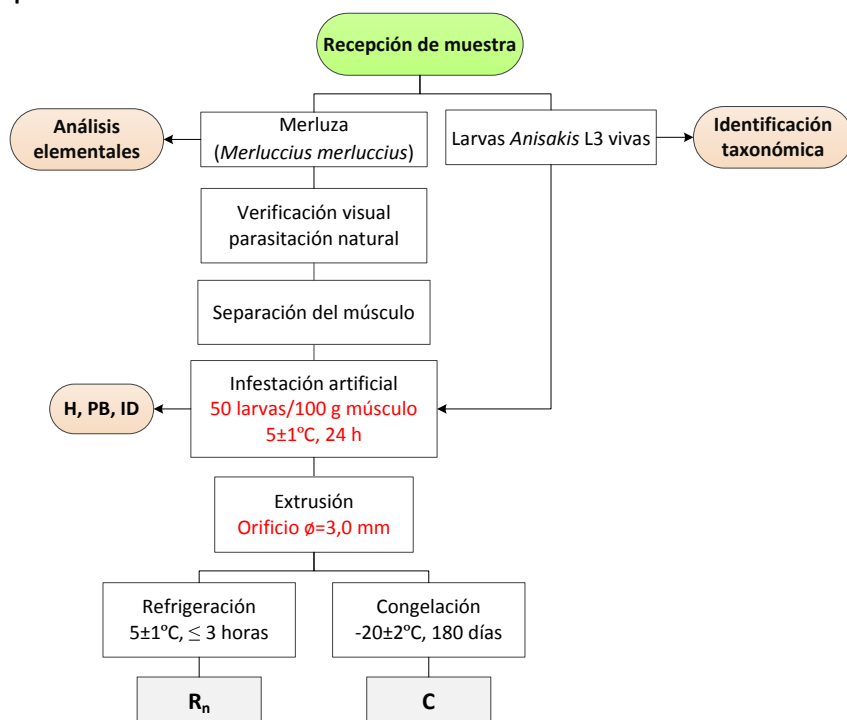
Las muestras obtenidas en esta etapa fueron utilizadas como materia prima para la elaboración de surimi tal y como se describe posteriormente en el Apartado 5.3.4.

5.3.3.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Larvas de *Anisakis* spp.

Las larvas vivas de *Anisakis* (L3) fueron obtenidas de ovarios y/o vísceras de merluzas (*Merluccius merluccius*) infestadas, capturadas en la zona de Pesca FAO 27 y suministradas en el mes de julio del 2011 por CEPTEC y Mercamadrid. Las larvas enviadas por CEPTEC fueron extraídas del mismo lote de merluzas utilizado en el experimento.

Recepción y preparación de las muestras



ETAPA II: Lavados sucesivos

Este proceso se realiza para R_n (Planta piloto) y C (Laboratorio)

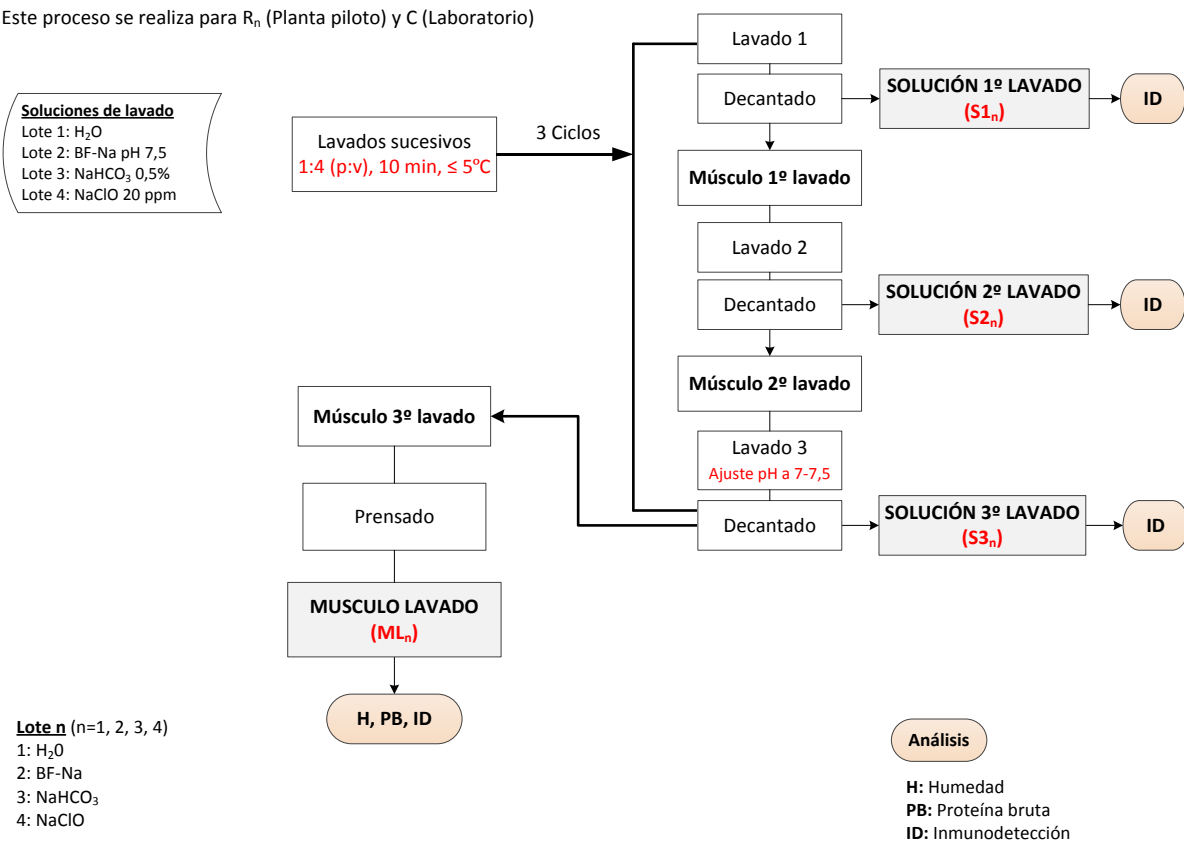


Figura 5.34 Esquema general de la etapa de lavados sucesivos de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo).

Separación mecánica del músculo



En planta piloto



Obtención del músculo lavado



Eliminación del exceso de agua

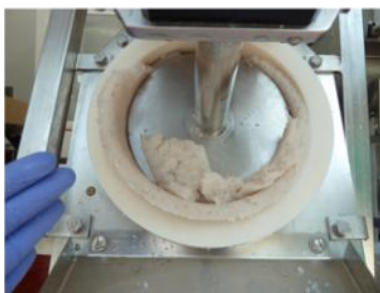


Figura 5.35 Imágenes de la etapa de lavados sucesivos.

Se utilizó un lote de aproximadamente 500 g de larvas incluyendo tejidos de vísceras que fueron almacenadas a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ (≤ 2 horas) hasta su acondicionamiento.

La preparación de las larvas para la identificación taxonómica se realizó siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

Pescado utilizado

Las merluzas (*Merluccius merluccius*) recepcionadas para este experimento fueron capturadas en la zona de Pesca VIIj-FAO 27 en julio del 2011 y suministradas por CETPEC. La longitud y el peso promedio de los pescados fueron $64,86\pm 2,52$ cm y $1,70\pm 0,15$ kg respectivamente. Se utilizó un lote de 21 merluzas que fueron conservadas en cámara de refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta su posterior distribución y uso.

Se siguió el Protocolo de recepción de muestra descrito en el Apartado 3.1.

Preparación de la muestra

Todo el proceso que se describe a continuación se realizó en la planta piloto del ICTAN.

Del lote de merluzas recepcionadas, se reservó 1 individuo para el acondicionamiento de las larvas, mientras que los 20 individuos restantes fueron descabezados manualmente y se separó el músculo de la piel y la espina en una extrusidora (Baader 694, Lübeck, Alemania) con orificios de tambor de 3,0 mm. De esta operación se obtuvieron 19,6 kg de músculo extrusionado y para un mejor manejo durante la infestación artificial fueron divididos en 4 lotes de 3,9 kg cada uno. El músculo restante fue reservado para el estudio de conservación en el tiempo ($\cong 1$ kg) y demás análisis ($\cong 3$ kg).

- Acondicionamiento de las larvas

Las larvas fueron separadas cuidadosamente del tejido (ovarios o vísceras) con pinzas y sometidas a lavados sucesivos con agua destilada. Se utilizaron todas las larvas recepcionadas y una vez limpias fueron mezcladas. Para obtener el peso

equivalente a la tasa de infestación establecida (50 larvas/100 g músculo) se contaron 50 larvas y se pesaron, este procedimiento se repitió hasta 3 veces. El peso promedio determinado para 50 larvas fue de $0,28 \pm 0,02$ g, a partir del cual se calculó que para infestar artificialmente lotes de 4 kg de músculo se necesitaban 11 g de larvas limpias por lote (peso equivalente a 2000 larvas).

La pieza de merluza reservada previamente fue fileteada manualmente y en una batidora-picadora (Hand processor accessory, Minipimer 5, Braun GmbH, Alemania) se obtuvo una pulpa homogénea. Se prepararon 4 lotes de 0,10 kg de pulpa cada uno y se infestaron con 11 g de larvas limpias. Finalmente, los 4 lotes obtenidos se conservaron en refrigeración ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 horas.

- Infestación artificial del músculo

Para la infestación artificial del músculo, se utilizaron los 4 lotes de músculo extrusionado descritos previamente. Por cada lote de 3,9 kg se añadieron los 0,10 kg de músculo infestado con 11 g de larvas (acondicionamiento de las larvas) y se mezclaron procurando una distribución homogénea. Para favorecer la penetración de las larvas al músculo los lotes fueron almacenados en refrigeración ($5 \pm 1^\circ\text{C}$) durante 24 horas.

En esta operación se obtuvieron 4 lotes de músculo extrusionado con infestación artificial (50 larvas/100 g músculo) y el peso de cada lote fue de 4 kg.

Las muestras reservadas para el estudio de conservación en el tiempo siguieron el mismo protocolo. Se infestó 1 kg de músculo extrusionado con una tasa equivalente a 50 larvas por cada 100 de músculo. Esta muestra se envasó a vacío, congeló y conservó a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ por un período de 180 días para su estudio en el tiempo.

- Extrusión

Con la finalidad de homogenizar el músculo infestado y verificar la retención de las larvas, antes de los lavados el músculo fue pasado a través del tambor perforado de la extrusora (orificios de 3,0 mm de diámetro). Cada lote ($\cong 4$ kg

cada uno) de músculo infestado sometido a extrusión se mantuvo en refrigeración ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$) hasta el momento de efectuar los lavados (≤ 3 horas por cada lote).

- **Obtención del músculo lavado a partir de músculo infestado refrigerado (larvas vivas) (R)**

En un tanque de 25 L de capacidad (Lavador de pescado, Prototipo, Planta piloto ICTAN) cada lote por separado fue sometido a tres lavados sucesivos manteniendo una relación músculo-solución de lavado de 1:4 (p:v) (Matsumoto y Noguchi, 1992; Hultin *et al.*, 2005; Carvajal *et al.*, 2005). Para el lavado con cada una de las soluciones se utilizaron 4 kg de músculo infestado inicial, utilizando cada vez 16 L de líquido (agua o soluciones) de lavado. Las soluciones de lavado utilizadas fueron previamente seleccionadas en trabajos preliminares (Apartado 5.3.3).

Para un mejor manejo del proceso, se prepararon soluciones concentradas que luego durante los lavados fueron diluidas con una mezcla de agua y hielo (previamente calculada) para conseguir la concentración requerida en el volumen de solución de lavado establecido (16 L para cada uno de los lavados). En todo momento se controló que la temperatura fuese inferior a 5°C y que el pH oscilara entre 7-7,5. En el caso en que el pH estuviese fuera de este rango, se ajustó a este rango durante el tercer lavado para no interferir en la formación de los geles finales.

Para eliminar el exceso de líquido entre lavados (1° y 2° lavado) el músculo se decantó durante 15 minutos y después del último lavado (3° lavado), el músculo se llevó a una prensa tornillo (Prensa tornillo, Baader 523, Lübeck, Germany) para facilitar la extracción de líquido. Se obtuvieron 4 lotes de músculo lavado y prensado (ML) en función a las soluciones de utilizadas.

Lote n (n=1, 2, 3, 4)

Lote 1: H_2O , Agua

Lote 2: BF-Na , Buffer fosfato sódico pH 7,5

Lote 3: NaHCO_3 , Bicarbonato sódico 0,5%

Lote 4: NaClO , Hipoclorito sódico 20 ppm

Una alícuota de las soluciones de lavado obtenidas en cada etapa (S1, S2 y S3) fueron reservadas en refrigeración ($5\pm1^{\circ}\text{C}$, ≤ 3 horas) para realizar los análisis correspondientes, mientras que los ML fueron mantenidos en refrigeración ($5\pm1^{\circ}\text{C}$, ≤ 3 horas) hasta su utilización en la siguiente etapa del proceso de obtención de surimi (Adición de crioprotectores, CP1 y CP2) (Apartado 5.3.4). Debido a las características de la planta piloto del ICTAN no se pudo realizar el proceso de refinado.

- Obtención del músculo lavado a partir de músculo infestado conservado en congelación (C)

Esta etapa del estudio se realizó con la finalidad de simular un proceso de fabricación de surimi a partir de músculo infestado congelado y evaluar el comportamiento de los alérgenos de *Anisakis* en la etapa de lavados sucesivos. Se utilizó el lote músculo infestado y extrusionado que había sido reservado previamente (1 kg) y conservado en congelación ($-20\pm2^{\circ}\text{C}$) durante 180 días (Figura 5.34).

El músculo infestado previamente descongelado ($5\pm1^{\circ}\text{C}$, ≤ 12 horas) siguió el procedimiento de lavados sucesivos descrito previamente, utilizando agua como solución de lavado (lote 1: H_2O), todo el proceso se realizó en los laboratorios del ICTAN.

El músculo lavado (ML) y las aguas de lavado obtenidas (S1, S2 y S3) se reservaron en refrigeración ($5\pm1^{\circ}\text{C}$) por un tiempo máximo de 3 horas o hasta la realización de los análisis correspondientes.

5.3.3.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

Para los estudios de identificación taxonómica, se siguió el procedimiento descrito en el Apartado 3.2.1.

Análisis elementales y pH

Se realizaron los análisis elementales y pH del músculo inicial según protocolo descrito en el Apartado 3.2.2.

Adicionalmente, se determinó el porcentaje de proteína bruta (Apartado 3.2.2.2) y se midió el pH (Apartado 3.2.2.5) del músculo infestado sin tratamiento (MP), músculos obtenidos después del 3° lavado (ML) y soluciones de lavado durante todo el proceso (S1, S2 y S3).

Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

La extracción y cuantificación de las proteínas alergénicas de los ML y soluciones de lavado (S1, S2 y S3) se realizó por DB (Apartado 3.2.6.2).

5.3.3.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado se describe en el Apartado 3.3.

5.3.3.3 Resultados y discusión

5.3.3.3.1 Identificación taxonómica de larvas de *Anisakis* spp.

Morfológicamente las larvas fueron clasificadas como tipo I e identificadas como *Anisakis simplex* s.s.

5.3.3.3.2 Análisis elementales y pH del músculo inicial

El contenido de humedad ($826,78 \pm 25,18 \text{ g kg}^{-1}$), proteína ($171,76 \pm 2,16 \text{ g kg}^{-1}$), cenizas ($12,43 \pm 0,23 \text{ g kg}^{-1}$) y grasa ($5,10 \pm 0,16 \text{ g kg}^{-1}$) del músculo de merluza se encuentran dentro de los valores reportados para esa especie (Tejada *et al.*, 2003a) y de acuerdo a los obtenidos en este trabajo de investigación. El pH del músculo inicial fue de $7,22 \pm 0,02$.

5.3.3.3.3 Composición del músculo lavado

En la Tabla 5.8 se presentan el porcentaje de humedad y proteína y valores de pH de músculo de merluza infestado artificialmente y las diferentes fracciones obtenidas en los lavados sucesivos con diferentes soluciones.

Tabla 5.8 Porcentaje (%) de humedad y proteína y valores de pH de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) y de las diferentes fracciones obtenidas en los lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$) con diferentes soluciones.

Lote		Humedad (%)	Proteína (%)	pH
Control	MP	$81,01 \pm 0,27^a$	$18,48 \pm 0,12^a$	$7,22 \pm 0,02^a$
Lote 1	ML	$88,60 \pm 0,15^b$	$11,93 \pm 0,58^b$	$6,77 \pm 0,02^b$
	S1		$1,58 \pm 0,05^{a/x}$	$7,10 \pm 0,04^{a/x}$
	S2		$1,13 \pm 0,10^{a/y}$	$7,20 \pm 0,02^{a/y}$
	S3		$0,59 \pm 0,13^{a/z}$	$7,34 \pm 0,02^{a/z}$
Lote 2	ML	$89,01 \pm 0,18^b$	$13,43 \pm 0,49^c$	$7,38 \pm 0,01^c$
	S1		$2,19 \pm 0,09^{b/x}$	$7,40 \pm 0,04^{b/x}$
	S2		$1,09 \pm 0,04^{a/y}$	$*7,59 \pm 0,02^{b/y}$
	S3		$0,70 \pm 0,10^{a/z}$	$7,44 \pm 0,04^{b/x}$
Lote 3	ML	$87,68 \pm 0,15^c$	$11,83 \pm 0,17^b$	$7,39 \pm 0,01^c$
	S1		$2,13 \pm 0,01^{b/x}$	$7,60 \pm 0,00^{c/x}$
	S2		$1,56 \pm 0,09^{b/y}$	$*8,30 \pm 0,02^{c/y}$
	S3		$0,86 \pm 0,03^{b/z}$	$7,40 \pm 0,01^{b/z}$
Lote 4	ML	$88,72 \pm 0,18^b$	$11,93 \pm 1,17^{bc}$	$7,10 \pm 0,01^d$
	S1		$2,09 \pm 0,04^{b/x}$	$7,12 \pm 0,02^{a/x}$
	S2		$1,24 \pm 0,08^{ac/y}$	$7,22 \pm 0,04^{a/y}$
	S3		$0,71 \pm 0,06^{a/z}$	$7,23 \pm 0,01^{c/y}$

(*) Se ajustó pH en el tercer lavado.

MP: Músculo infestado sin tratamiento (Control); **ML:** Músculo obtenido después del 3° lavado; **S1:** Solución del 1° lavado; **S2:** Solución del 2° lavado; **S3:** Solución del 3° lavado; **Lote 1:** H₂O; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO₃ 0,5%; **Lote 4:** NaClO 20 ppm. Letras diferentes (a, b, c...) en la misma columna significan diferencias entre lotes ($p < 0,05$). Letras diferentes (x, y, z) en la misma columna significan diferencias entre fracciones Sn del mismo lote ($p < 0,05$).

El contenido de humedad en los músculos lavados y prensados (ML) fue significativamente superior a la del lote control sin lavar y osciló entre 87 y 89%, valores similares se encontraron en estudios preliminares (Apartado 5.3.2.2, Tabla 5.8). Entre los distintos lotes lavados sólo se encontraron diferencias significativas de humedad con el correspondiente ML del lote 3 (NaHCO_3).

Para obtener un surimi y posteriormente un gel de buena calidad, es recomendable eliminar el exceso de agua hasta obtener una pulpa lavada con un 75-80% de humedad (Borderías y Tejada, 1987; Alvarez, 1993, Tejada *et al.*, 1995). Sin embargo, en nuestro caso al tratarse de un proceso realizado de forma experimental, y dadas las condiciones de equipamiento de la planta piloto del ICTAN, no se logró eliminar el agua adsorbida a los niveles recomendados.

En todos los lotes se observó un contenido significativamente menor de proteína en los músculos lavados (ML) respecto al músculo infestado sin tratamiento (MP), y dependiendo del lote osciló entre 11 y 13%. El ML del lote 2 (BF-Na) presentó una mayor cantidad de proteína, evidenciando diferencias significativas a respecto a los músculos lavados de los otros lotes.

Durante los lavados sucesivos el contenido de proteína disminuyó significativamente ($S1 > S2 > S3$) en todos los lotes y siguió el mismo comportamiento que el observado en trabajos preliminares (Apartados 5.3.2.1 y 5.3.2.2). En el primer lavado la mayor cantidad de proteína la obtuvo el S1 del lote 2 (BF-Na) aunque la diferencia sólo fue significativa con el S1 del lote 1 (H_2O). Durante el segundo y tercer lavado, los S2 y S3 del lote 3 (NaHCO_3) obtuvieron un contenido de proteína significativamente mayor a los correspondientes S2 y S3 de los otros lotes.

Las fracciones solubles (S1, S2 y S3) del lote 3 (NaHCO_3) fueron las que mayor porcentaje de proteína obtuvieron y coincidió con un mayor valor de pH durante los dos primeros lavados (7,6 y 8,3 respectivamente, Tabla 5.8).

El pH varió en función a la solución utilizada durante los lavados y en todos los casos se encontraron diferencias significativas respecto al control sin tratamiento. El ML del lote 1 (H₂O) fue el que menor valor de pH obtuvo al final del lavado.

Durante la etapa de lavado para la obtención de surimi, la variación del contenido de agua y proteína está íntimamente relacionada y depende de la variación del pH en el medio, por lo que se recomienda que el pH final esté en el rango de 7-7,5 (Okada, 1981; Park, 2005). En nuestro caso, la solubilización de las proteínas alergénicas durante las diferentes etapas de lavado favorece su eliminación. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en el proceso de elaboración de surimi, un pH excesivamente alto puede influir en el proceso de gelificación para obtener productos finales. Por ello, se ajustó el pH únicamente en el último lavado para que se favoreciese la eliminación en los lavados intermedios (S1 y S2) y que el músculo lavado final estuviera dentro de este rango (pH 7-7,5), tal como se hizo en los lotes 2 y 3 (BF-Na y NaHCO₃).

5.3.3.3.4 Efecto del lavado de músculo infestado refrigerado (R) en la extracción y detección de alérgenos

En esta etapa de la operación de lavado se evaluó el efecto de diferentes soluciones de lavado en la eliminación y detección de alérgenos en músculo infestado con larvas vivas y sometido a lavados sucesivos.

En la Figura 5.36 se presenta el porcentaje de proteína respecto al músculo inicial y la cantidad de antígenos de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* en las distintas fracciones obtenidas (ML, S1, S2 y S3).

Los porcentajes de proteína en el músculo y soluciones de lavado se han mostrado en la Tabla 5.8 y en esta parte del análisis se presentan gráficamente para hacer la comparación con los alérgenos extraídos durante los lavados.

LAVADOS (ML, S1, S2 y S3)

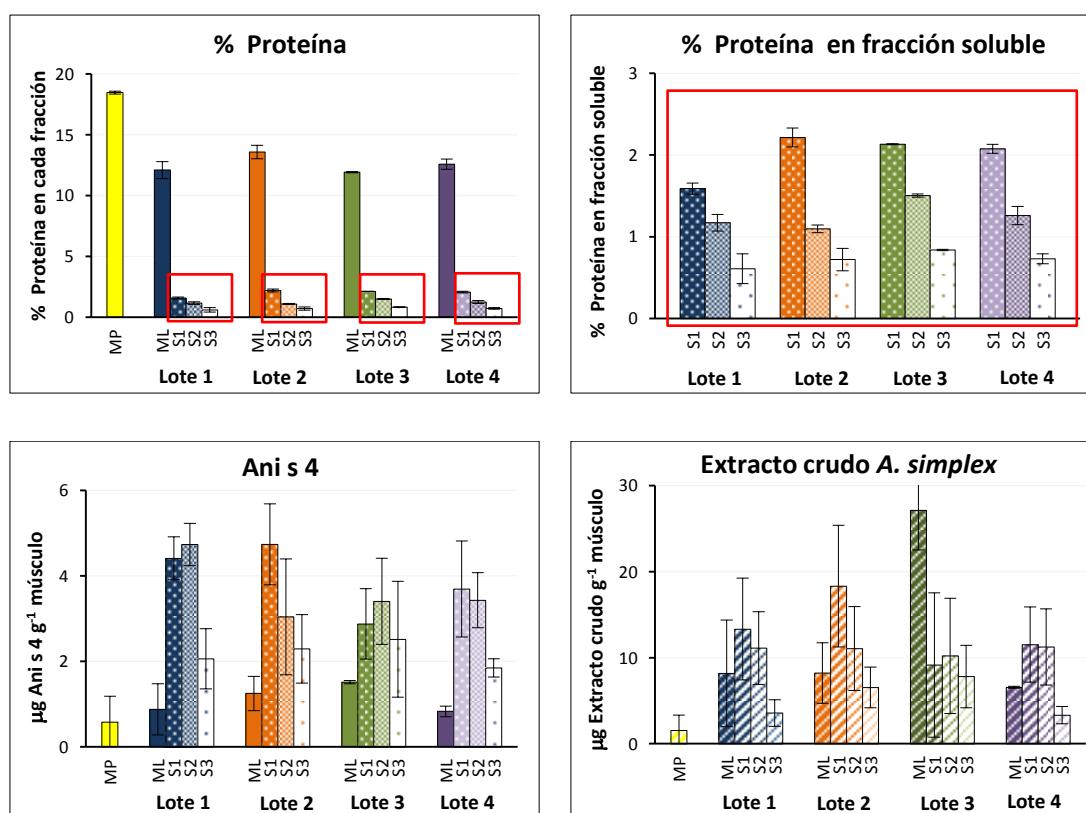


Figura 5.36 Porcentaje de proteína (%) y antígenos de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo lavado y soluciones de lavado. **MP**: Músculo infestado sin tratamiento (muestra control); **ML**: Músculo obtenido después del 3º lavado; **S1**: Solución del 1º lavado; **S2**: Solución del 2º lavado; **S3**: Solución del 3º lavado; **Lote 1**: H_2O ; **Lote 2**: BF-Na pH 7,5; **Lote 3**: NaHCO_3 0,5%; **Lote 4**: NaClO 20 ppm.

Inmunodetección de alérgenos

- Ani s 4

La detección de Ani s 4 en los músculos lavados (ML) fue mayor respecto al músculo infestado sin tratamiento (MP), aunque las diferencias no fueron significativas (Figura 5.36). Entre lotes la menor detección se observó en el ML del lote 4 (NaClO) y la diferencia sólo fue significativa con el ML del lote 3 (NaHCO_3).

En el primer lavado la mayor detección de Anis 4 se obtuvo en las S1 de los lotes 1 y 2 (H_2O y BF-Na) y las diferencias sólo fueron significativas con la correspondiente S1 del lote 3 (NaHCO_3). A medida que se continuó lavando en ninguno de los lotes se observaron diferencias significativas entre los respectivos S1 y S2, aunque la S2 del lote 1 (H_2O) presentó una detección significativamente mayor que los S2 del resto de los lotes. En el tercer lavado, si bien la menor cantidad de Anis 4 se observó en el S3 del lote 4 (NaClO) las diferencias entre lotes no fueron significativas. Sin embargo, en el estudio preliminar (Apartado 5.3.2.2, Figura 5.32) sólo se observó eliminación de Anis 4 en el S3 del lote 3 (NaHCO_3).

En todos los lotes del presente estudio, la cantidad detectada de Anis 4 en las diferentes fracciones obtenidas fueron superiores a las reportadas previamente (Apartado 5.3.2.2).

- **Extracto crudo de *A. simplex***

La detección de Extracto crudo de *A. simplex* en los músculos lavados (ML) fue significativamente superior a la presentada por el músculo infestado sin tratamiento (MP). Entre lotes la mayor detección la obtuvo el ML del lote 3 (NaHCO_3), la diferencia fue significativa respecto al resto de lotes y coincidió con un mayor valor de pH durante los lavados sucesivos (Tabla 5.8).

En las soluciones de lavado, la mayor detección de Extracto crudo de *A. simplex* se obtuvo en la S1 del lote 2 (BF-Na), aunque entre lotes las diferencias no fueron significativas. En el segundo lavado el comportamiento coincidió con el observado en los estudios preliminares (Apartado 5.3.2.2). Entre lotes no se observaron diferencias significativas entre S1 y S2, y tampoco entre los correspondientes S2. En el tercer lavado, las diferencias entre lotes no fueron significativas, aunque el S3 de los lotes 2 y 3 (BF-Na y NaHCO_3) fueron los que mayor detección obtuvieron.

Los valores detectados de Extracto crudo de *A. simplex* fueron inferiores a los reportados en el Apartado 5.3.2.2.

En todas las fracciones obtenidas (ML, S1, S2 y S3) los valores detectados de Anis s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* fueron significativamente superiores a los obtenidos en el lote control sin tratamiento (MP), lo que apoya la hipótesis de que el lavado produce modificaciones en el músculo que facilita la extracción y detección de antígenos y alérgenos de *Anisakis*, tal como se discutió previamente en el Apartado 5.3.2.2.

Las diferencias encontradas con el estudio preliminar pueden deberse a la presencia de larvas vivas que debido al estrés al que son sometidas podrían liberar una mayor cantidad de alérgenos durante la etapa de lavado. También debemos considerar que se utilizaron diferentes lotes de larvas y tal como se ha mencionado, la capacidad alergénica varía en función a la especie de *Anisakis* (Arizono *et al.*, 2012).

Dado que el músculo lavado (ML) se convierte en la materia prima para la elaboración de surimi, la importancia de esta etapa radica en la mayor eliminación de alérgenos del músculo dependerá de las condiciones de lavado utilizadas y se verá reflejada en las soluciones de cada lavado (S1, S2 y S3).

5.3.3.3.5 Efecto del lavado de músculo infestado congelado (C) en la extracción y detección de alérgenos

Con la finalidad de verificar si la alta tasa de detección de alérgenos en el músculo lavado era debida a la presencia de larvas vivas en el músculo infestado, que pudiera producir una mayor excreción durante los lavados debido a la diferencia del medio y condiciones de lavado, se evaluó el comportamiento de los alérgenos al someter músculo infestado congelado a lavados sucesivos. Se utilizó como control inicial al músculo infestado refrigerado (lote R) lavado con agua (lote 1: H₂O) y se realizó un estudio comparativo con el músculo conservado en congelación (-20±2°C) durante 180 días (lote C) sometido a lavados sucesivos con agua.

En la Figura 5.37 se presenta el porcentaje de proteína respecto al músculo inicial y la cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* en las distintas fracciones obtenidas (ML, S1, S2 y S3); mientras que en la Figura 5.38 se muestra el porcentaje que representa cada solución de lavado (S1 y S2 y S3) en la detección de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* de toda la fracción soluble (S1+S2+S3).

En el músculo infestado congelado (C) se evidenció un menor porcentaje de proteína respecto al músculo infestado refrigerado (R) y la diferencia fue significativa. Entre lotes de músculos lavados (ML) no se encontraron diferencias significativas de proteína en función del tiempo de conservación en congelación.

Durante el primer lavado (S1), la cantidad de proteína obtenida en el lote C fue significativamente mayor a la obtenida en el correspondiente S1 del lote R. En los lavados sucesivos (S2 y S3) la cantidad de proteína obtenida disminuyó con el número de lavados en ambos lotes aunque en el lote C este descenso fue mucho más marcado y significativamente inferior al obtenido en el lote R.

Inmunodetección de alérgenos

- Ani s 4

No se evidenciaron diferencias significativas entre los lotes MP y ML respecto al tiempo de congelación, aunque se observó una disminución de Ani s 4 en el músculo infestado (MP) del lote C respecto al R (Figura 5.37).

La cantidad de Ani s 4 detectada en las 3 soluciones de lavado fue superior en todas las fracciones del lote R respecto al lote C, lo que sugiere una mayor secreción de alérgenos por la presencia de larvas vivas durante todo el proceso de lavado, que posteriormente fueron eliminadas en las soluciones de lavado (S1, S2 y S3).

Tal como se describió en los Apartados 5.3.2.2 y 5.3.3 (Figuras 5.32 y 5.36) la cantidad de Ani s 4 detectada en las fracciones solubles (S1, S2 y S3) fue superior a la obtenida en el músculo infestado sin tratamiento (MP).

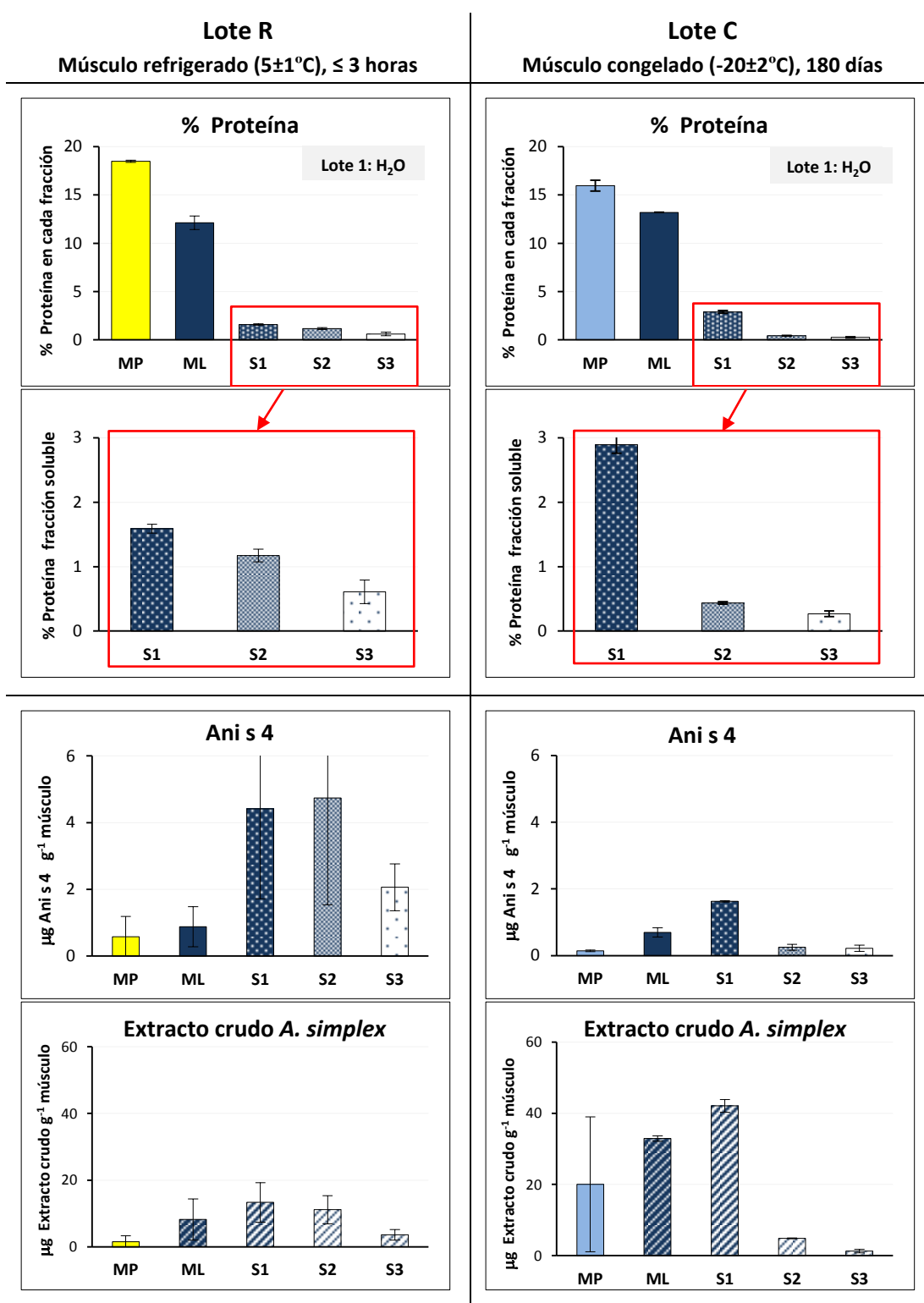


Figura 5.37 Porcentaje de proteína (%) respecto al músculo inicial y cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) refrigerado ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$, ≤ 3 horas) y conservado en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 180 días) y sometido a lavados sucesivos con agua (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$). **MP**: Músculo infestado sin tratamiento; **ML**: Músculo después del 3° lavado; **S1**: Solución del 1° lavado; **S2**: Solución del 2° lavado; **S3**: Solución de 3° lavado.

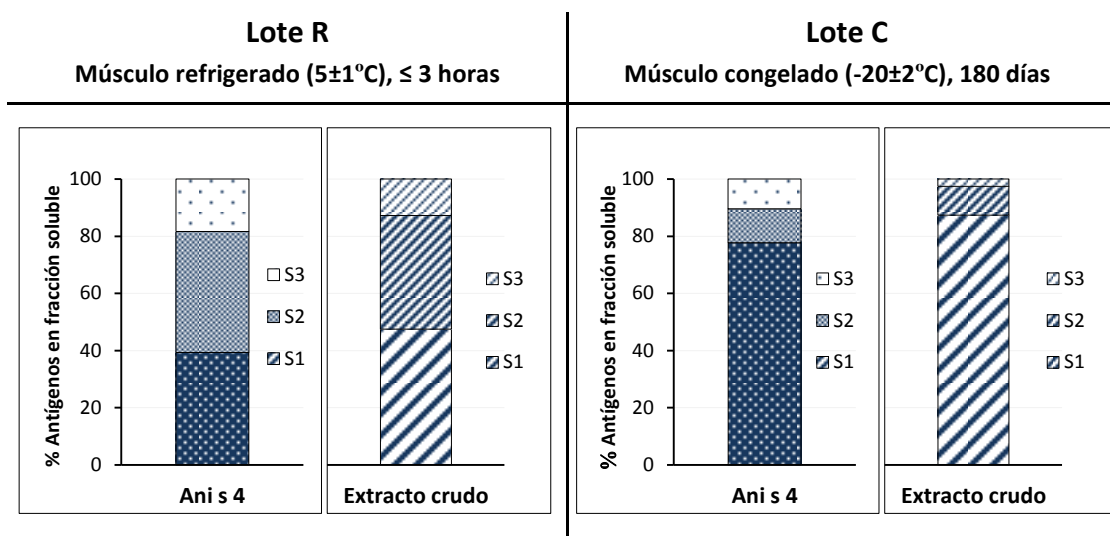


Figura 5.38 Porcentaje (%) de detección de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* que representa cada solución de lavado (S1, S2 y S3) en toda la fracción soluble (S1+S2+S3), obtenidas durante la etapa de lavado de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo). **S1**: Solución del 1º lavado; **S2**: Solución del 2º lavado; **S3**: Solución de 3º lavado.

En general, la cantidad detectada en cada lote R o C se corresponde con la cantidad de proteína extraída en cada fracción, por lo que los porcentajes relativos a cada lote difieren. En el lote R los porcentajes de Ani s 4 encontrados en S1, S2 y S3 fueron 39%, 42% y 18% respectivamente frente al total detectado en las 3 fracciones, mientras que en el lote C fueron 78%, 12% y 10% (Figura 5.38).

- Extracto crudo de *A. simplex*

Los MP y ML del lote congelado (C) obtuvieron una detección significativamente mayor al obtenido en el lote refrigerado (R), encontrándose diferencias significativas entre lotes R y C en cada fracción (Figura 5.37). En las soluciones de lavado, la mayor detección de Extracto crudo de *A. simplex* se observó en S1 del músculo congelado (C), que representó el 87% de la detección de toda la fracción soluble de este lote (Figura 5.38). En el lote R la cantidad total detectada fue mucho menor que en el lote C, siendo las fracciones S1 y S2 en las que se obtuvo mayor cantidad de alérgeno. La cantidad de Extracto crudo de *A. simplex* detectado

en las soluciones de lavado del lote C guarda una relación directa con el porcentaje de proteína extraída en este lote.

La presencia de alérgenos de *Anisakis* durante la conservación en congelación de músculo infestado ha sido estudiada por otros autores (Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2010) y sugieren que una congelación prolongada podría producir una disminución de la detección de Ani s 4 aunque no una eliminación total de los mismos.

Aunque en un inicio se planteó que la menor detección de alérgenos podría estar relacionada con una menor extracción de Ani s 4 al agregarse las proteínas miofibrilares durante la conservación en congelación, en estudios realizados en músculo infestado en donde se evaluó la modificación de la extractibilidad de la proteína en condiciones de congelación (Apartado 5.2) se comprobó que a pesar de que la solubilidad proteica disminuyó hasta un 27% (Figura 5.11, Lote C, infestación artificial, 12 larvas/100 g músculo, congelación a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 293 días), se logró detectar Ani s 4 en el músculo hasta el final de la conservación en congelación (406 días).

La importancia de la etapa de lavados radica en la mayor eliminación de proteínas alergénicas del músculo que en nuestro caso se vio reflejada en la detección de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* en las soluciones obtenidas en cada lavado.

En todos los lotes estudiados, el músculo infestado sin tratamiento (MP) presentó una menor detección de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* respecto a las fracciones obtenidas en los lavados (ML, S1, S2 y S3), lo que nos indica que durante los lavados se producen modificaciones en el músculo que facilitan la extracción y detección de antígenos y alérgenos de *Anisakis*.

Al estudiar el efecto de la congelación del músculo infestado, los resultados obtenidos indicaron que una congelación prolongada facilita la detección de Extracto crudo de *A. simplex*.

5.3.4 Elaboración de surimi y efecto de la conservación en congelación

El proceso general obtención de surimi y geles se ha descrito con anterioridad en el Apartado 5.3, en tal sentido en esta parte introductoria sólo se hará hincapié a las etapas del proceso que consideramos que pueden afectar al comportamiento de los alérgenos de *Anisakis*.

Mecanismo crioprotector en el surimi

Para facilitar la comercialización del surimi se recurre normalmente a la congelación. Sin embargo, se comprobó que tras la descongelación las proteínas miofibrilares perdían parte de su capacidad formadora de geles, lo que se asoció a fenómenos de agregación intermolecular cuando el agua se inmoviliza en forma de hielo. Fue a partir de los años 70 con el grupo Nishiya que se comenzó a utilizar diversos tipos de crioprotectores (aminoácidos y derivados, ácidos carboxílicos y sus sales y ciertos carbohidratos), lo que permitió la producción del surimi a gran escala y la difusión masiva de los productos derivados (Matsumoto y Noguchi, 1992).

En la industria del surimi los crioprotectores más utilizados son los azúcares en cantidades $\leq 8\%$ en el producto final. Por lo general, se utilizan en una mezcla con azúcar (sacarosa) y sorbitol a fin de proporcionar un sabor menos dulce y no potenciar la reacción de Maillard, que tendría lugar durante el tratamiento térmico del surimi para su gelificación si se utilizasen azúcares reductores tales como la glucosa (Borderías y Tejada, 1987; Matsumoto y Noguchi, 1992).

Los polifosfatos se añaden hasta concentraciones del 0,2-0,3% ya que cantidades superiores no son convenientes pues imparten un sabor no aceptable. Los glicéridos sirven para reducir el tamaño de los cristales de hielo que se forman durante la congelación y también proporcionan una mayor suavidad en el producto terminado (Park *et al.*, 1988; Carvajal *et al.*, 2005).

El mecanismo de acción de los crioprotectores aún no se conoce del todo y se han propuesto dos teorías para justificar la acción crioprotectora. Matsumoto (1980)

considera que las moléculas crioprotectoras pueden unirse a las proteínas por alguno de sus grupos funcionales mediante enlaces iónicos o de hidrógeno mientras que el otro o los otros grupos funcionales pueden hidratarse, y de esta forma cada molécula de proteína se reviste con el agente crioprotector. El mecanismo propuesto por Arakawa y Timasheff (1982) considera que la adición de azúcares a una solución acuosa de proteína resulta en un cambio desfavorable de energía libre (ΔG) que conduce a la estabilización del soluto excluyéndolo de la superficie y permitiendo que la proteína sea hidratada. La magnitud del ΔG es proporcional a la superficie de la proteína que cuando se despliega (desnaturaliza) se incrementa. Esto indica que el estado nativo de la proteína está favorecido termodinámicamente en soluciones de bajo peso molecular.

Además, los crioprotectores también protegen las proteínas del músculo durante la conservación en congelación deprimiendo el punto de congelación (MacDonald y Lanier, 1991).

Entre las sustancias que se utilizan en la industria y en consecuencia muy investigadas están los polifosfatos aunque su mecanismo de acción tampoco está muy claro. Al respecto se han ofrecido diversas teorías, algunos autores atribuyen su efecto al mecanismo de los grupos $-\text{PO}_4\text{H}_2$ que harían como puentes entre las proteínas y el agua (Noguchi, 1971; 1984; Borderías y Tejada, 1987), mientras que otros opinan que el único efecto de los polifosfatos es magnificar la acción de los azúcares (Matsumoto y Noguchi, 1992). Aunque también existe la teoría que los polifosfatos no intervienen como protectores proteicos, pero que ayudan a mejorar la capacidad funcional de la formación del gel (Noguchi, 1984).

Independientemente de mecanismo de acción sobre las proteínas del músculo, su utilización en surimi fabricado a partir de pescado infestado con *Anisakis* podría modificar el comportamiento de los alérgenos de *Anisakis* durante su conservación.

5.3.4.1 Objetivo

El objetivo general fue eliminar o disminuir la presencia de alérgenos de *Anisakis* durante el proceso de elaboración y conservación del surimi, y en esta parte del proceso (Etapa III del proceso general de obtención de surimi y geles) se evaluó el efecto de los crioprotectores más utilizados en la industria en la elaboración de surimi en el comportamiento de los alérgenos de *Anisakis*. Se utilizaron:

- Dos combinaciones de crioprotectores para la conservación del surimi.
- Diferentes tiempos y condiciones de conservación del surimi.

5.3.4.2 Diseño del experimento

En la Figura 5.39 se presentan el esquema general de esta etapa del proceso de obtención de surimi y en la Figura 5.40 se adjuntan algunas imágenes del mismo.

5.3.4.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Los músculos lavados y prensados (ML), conservados en refrigeración ($5\pm1^{\circ}\text{C}$, ≤ 3 horas) se obtuvieron en la etapa de lavado (Etapa II del proceso general de elaboración de surimi y geles, Figura 5.16) descrita en el Apartado 5.3.3. Se obtuvieron 4 lotes de ML en función a la solución de lavado utilizada.

Lote n (n=1, 2, 3, 4)

Lote 1: H_2O , Agua

Lote 2: BF-Na , Buffer fosfato sódico pH 7,5

Lote 3: NaHCO_3 , Bicarbonato sódico 0,5%

Lote 4: NaClO , Hipoclorito sódico 20 ppm

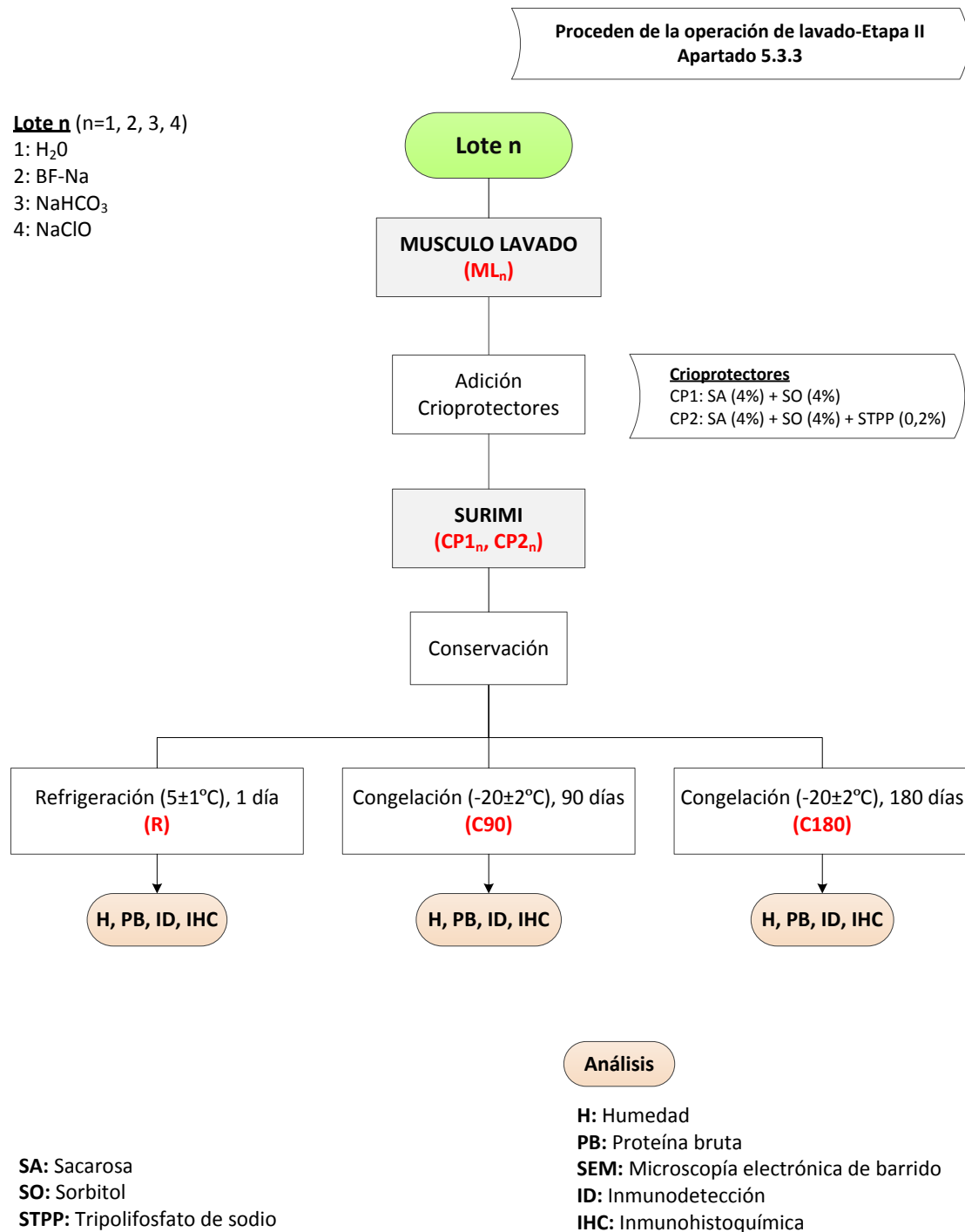


Figura 5.39 Esquema general de elaboración de surimi a partir de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) lavado con diferentes soluciones y obtenido en la etapa anterior (Apartado 5.3.3).

Adición de crioprotectores



Figura 5.40 Imágenes de la etapa de adición de crioprotectores en el proceso de elaboración de surimi.

- Adición de crioprotectores

Con la finalidad de proteger la proteína del daño producido por congelación, se adicionaron al músculo lavado los crioprotectores más utilizados en la industria de surimi, como sacarosa (SA), sorbitol (SO) [420(i)] y tripolifosfato de sodio (STPP) [451(i)]. En función del lote de surimi a elaborar, por cada 100 de músculo lavado se utilizó 4 g de sacarosa, 4 g de sorbitol o 0,2 g de STPP (Herrera y Mackie, 2004; Park y Lin, 2005). Para cada lote de músculo lavado (ML) se obtuvieron 2 tipos de surimis (CP1 y CP2) dependiendo de la combinación de crioprotectores utilizada, obteniéndose un total de 8 lotes en esta etapa.

Lote n (n=1, 2, 3, 4)

Surimi 1 (CP1): SA (4%) + SO (4%)

Surimi 2 (CP2): SA (4%) + SO (4%) + STPP (0,2%)

El mezclado con los crioprotectores se llevó a cabo a vacío en una homogeneizadora picadora con refrigeración (Stephan UM5, Stephan u. Söhne GmbH & Co., Hameln, Alemania), durante 1 minuto hasta conseguir una masa completamente homogénea. En esta etapa se verificó el pH y se controló que la temperatura fuera inferior a 5°C. Para un mejor manejo y conservación, los surimis fueron envasados en bolsas a vacío

(Cryovac BB4L, Barcelona, España) de 500 g y distribuidos de acuerdo al lote y a los controles a realizar en el tiempo.

Para los estudios en el tiempo, los lotes de surimis fueron refrigerados ($5\pm1^{\circ}\text{C}$, 1 día) (R) y conservados en congelación a $-20\pm2^{\circ}\text{C}$ durante 90 y 180 días (C90 y C180) como se indica en el esquema de la Figura 5.39.

5.3.4.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

En todas las muestras se evaluó el porcentaje de humedad (Apartado 3.2.2.1) y proteína bruta (Apartado 3.2.2.2), y se determinó el pH (Apartado 3.2.2.5).

Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

La inmunodetección por DB se realizó en todos los lotes de surimi (Apartado 3.2.6.2), mientras que la IHC (Apartado 3.2.6.3) se aplicó a muestras seleccionadas del lote 1 (H_2O).

5.3.4.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado se describe en el Apartado 3.3. En el caso de las muestras para IHC el área de estándar (S_a) en todas las micrografías fue $1,65083948\ \mu\text{m}^2$.

5.3.4.3 Resultados y discusión

5.3.4.3.1 Composición de los surimis

En la Tabla 5.9 se presentan el porcentaje de humedad y proteína y valores de pH de los diferentes surimis (CP1 y CP2) obtenidos en el control en refrigeración (R). En cada control realizado se verificaron estos componentes y no se evidenciaron diferencias significativas con respecto al tiempo de conservación en congelación.

Tabla 5.9 Porcentaje (%) de humedad y proteína y valores de pH de surimis refrigerados ($5\pm1^{\circ}\text{C}$, 1 día).

Lote		Humedad (%)	Proteína (%)	pH
1	CP1	$83,88 \pm 0,34^a$	$9,41 \pm 0,27^a$	$6,94 \pm 0,02^a$
	CP2	$83,32 \pm 0,37^a$	$8,62 \pm 0,88^a$	$6,95 \pm 0,02^a$
2	CP1	$82,84 \pm 0,14^a$	$10,19 \pm 0,69^a$	$7,06 \pm 0,04^a$
	CP2	$82,85 \pm 0,06^a$	$10,72 \pm 0,34^a$	$7,16 \pm 0,02^a$
3	CP1	$82,31 \pm 0,37^a$	$9,88 \pm 0,13^a$	$7,58 \pm 0,02^a$
	CP2	$82,03 \pm 0,22^a$	$9,56 \pm 0,11^a$	$7,67 \pm 0,01^a$
4	CP1	$83,72 \pm 0,16^a$	$10,06 \pm 0,04^a$	$7,12 \pm 0,04^a$
	CP2	$83,89 \pm 0,39^a$	$9,74 \pm 0,30^a$	$7,38 \pm 0,02^a$

CP1: Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%); **Lote 1:** H₂O; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO₃ 0,5%; **Lote 4:** NaClO 20 ppm. Letras diferentes (a, b, c) en la misma columna significan diferencias con respecto al control y entre lotes ($p<0,05$).

El contenido de humedad de los surimis (CP1 y CP2) osciló entre 82 y 83%, no encontrándose diferencias significativas entre lotes, tipos de surimi y tiempo de conservación. Dependiendo del lote, el porcentaje de proteína estuvo alrededor del 9 y 11%, mientras que el pH osciló entre 6,94 y 7,67. El menor porcentaje de humedad y proteína en los surimis respecto al músculo lavado (ML) del que partieron, se debió a la adición de crioprotectores en su formulación.

5.3.4.3.2 Efecto de los crioprotectores y de la conservación en congelación en la detección de proteínas alergénicas

En esta etapa a partir de los músculo lavados (ML) obtenidos, se evaluó el efecto de la adición de dos combinaciones de crioprotectores (CP1 y CP2) en la detección de la alergenicidad de surimis refrigerados ($5\pm1^{\circ}\text{C}$) durante 1 día (R) y conservados en congelación ($-20\pm2^{\circ}\text{C}$) durante 90 y 180 días (C90 y C180).

En la Figura 5.41 se presenta el porcentaje de proteína y la cantidad de antígenos de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) detectados en músculos lavados (ML) y surimis (CP1 y CP2) conservados en refrigeración (R) y surimis conservados en congelación (C90 y C180).

SURIMI (CP1 y CP2)

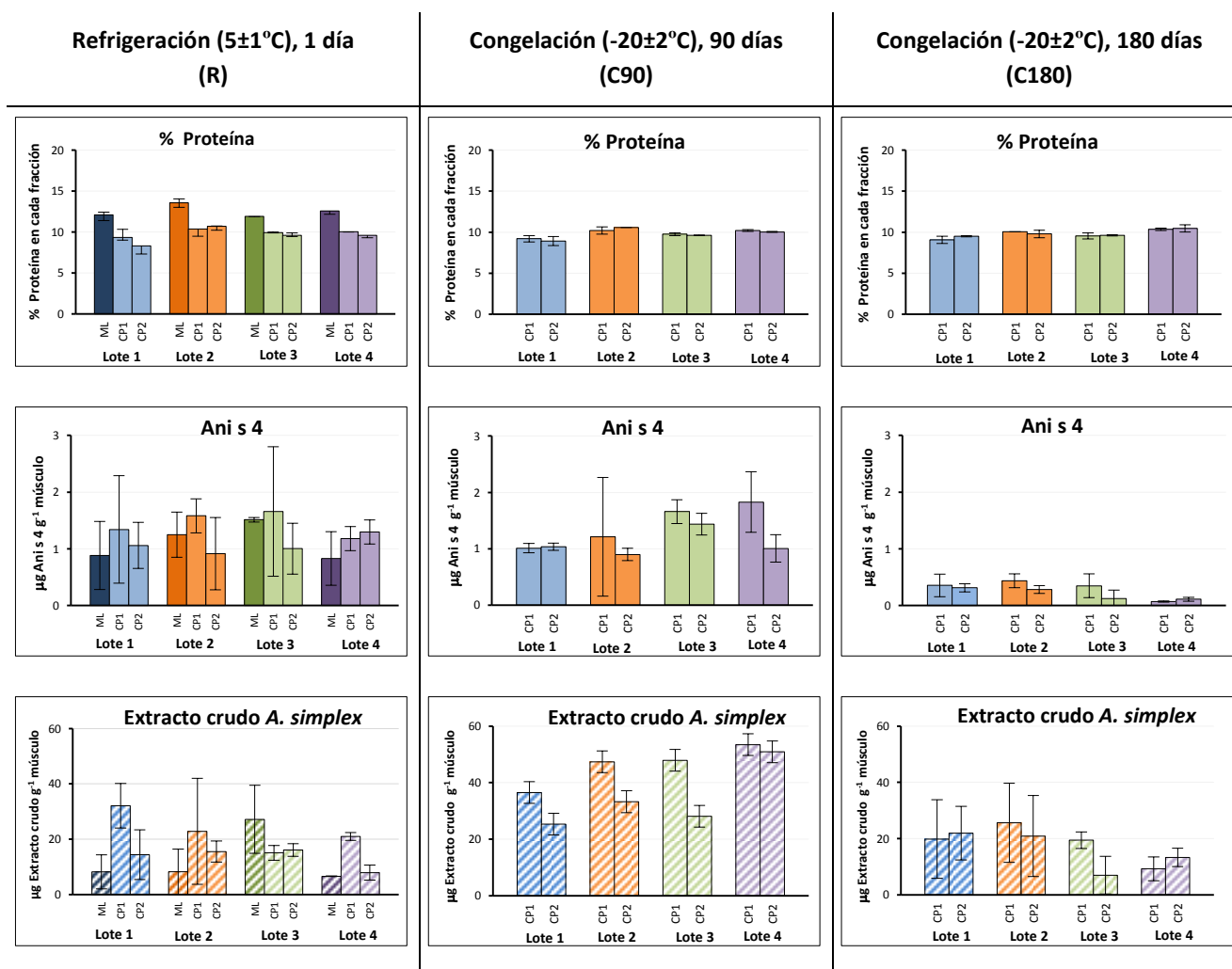


Figura 5.41 Porcentaje de proteína (%) y cantidad de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculos lavados y surimis con diferentes crioprotectores, refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 1 día) y conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$, 90 y 180 días). **Lote 1:** H_2O ; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5%; **Lote 4:** NaClO 20 ppm; **ML:** Músculo después del 3º lavado; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%).

En todos los lotes de surimis (CP1 y CP2) debido a la adición de crioprotectores (8%) se observó una disminución de proteína con respecto a los correspondientes músculos lavados (ML). No se evidenciaron cambios significativos en el porcentaje de proteína entre lotes, tipos de surimis (CP1 y CP2) ni durante la conservación en refrigeración (R) y tiempo de conservación en congelación (C90 y C180).

Los análisis de humedad y proteína se realizaron con la finalidad de verificar las posibles variaciones de estos componentes por efecto de la congelación prolongada o por la posible desecación durante la congelación.

Inmunodetección de alérgenos

- Ani s 4

En refrigeración (R) no se encontraron diferencias significativas en la detección de Ani s 4 en los surimis respecto al músculo lavado del que fueron elaborados (Figura 5.41). Los surimis CP2 presentaron la menor detección de Ani s 4 respecto a CP1 aunque las diferencias no fueron significativas. Las diferencias entre surimis elaborados con el mismo lote, disminuyeron durante la conservación en congelación, excepto en el lote 4 (NaClO) a los 90 días de conservación (C90) en el que se detectó más Ani s 4 en el CP1. El efecto de la congelación en Ani s 4 se evidenció a los 180 días, si bien el comportamiento entre tipos de surimis fue similar al observado en C90, la detección de Ani s 4 disminuyó durante la conservación en congelación, evidenciándose diferencias significativas en todos los lotes entre los estudios efectuados a 90 y 180 días (C90 y C180). Los surimis del lote 4 (NaClO) fueron los que menor detección de Ani s 4 presentaron al final de la conservación en congelación.

Al contrastar los resultados del lote 1 (H₂O) con los obtenidos en el Apartado 5.3.3 (Figura 5.37) se observó una disminución de Ani s 4 en los surimis respecto al músculo conservado en congelación (C180) y posteriormente lavado, aunque las diferencias no fueron significativas.

- **Extracto crudo de *A. simplex***

Con excepción del lote 3 (NaHCO_3), en todos los casos la detección de Extracto crudo de *A. simplex* fue superior en los surimis CP1 que en el músculo lavado (ML), aunque en algunos casos la diferencia no fue significativa (Figura 5.41). Entre tipo de surimis, con excepción del lote 3, la menor detección en refrigeración (R) se observó en los surimis CP2. A los 90 días de conservación en congelación (C90) se detectó un incremento significativo en la cantidad de Extracto crudo de *A. simplex* en los surimis de todos los lotes respecto a los lotes refrigerados. En el estudio C90 los surimis que menor detección obtuvieron fueron los correspondientes al lote 1 (H_2O). Posteriormente, a los 180 días (C180) en todos los lotes y tipos de surimi se observó un descenso de Extracto crudo de *A. simplex* por efecto de la congelación prolongada, evidenciándose diferencias significativas respecto al tiempo de conservación de los surimis, comportamiento que no fue tan acusado como el observado en Anis 4.

Al comparar los surimis del lote 1 con los resultados obtenidos en el Apartado 5.3.3 (Figura 5.37) se observó que los valores detectados de Extracto crudo de *A. simplex* en el músculo conservado en congelación (C180) y posteriormente lavado fueron superiores a los obtenidos en los surimis C180, y las diferencias sólo fueron significativas en los CP2, comportamiento que difirió con el estudio en refrigeración realizado en el mismo lote.

De forma general, en todos los lotes de surimi se evidencia una disminución en la detección de Anis 4, comportamiento que fue más acusado a los 180 días de conservación en congelación del surimi. En el caso del Extracto crudo de *A. simplex* los valores detectados al final de la conservación (C180) apenas mostraron diferencias con los obtenidos en refrigeración (R). La mayor o menor detección estuvo en función al lote evaluado, tipo de surimi y tiempo de conservación.

El comportamiento observado en la detección de los alérgenos de *Anisakis* en los surimis puede atribuirse al uso de dos combinaciones de crioprotectores en su formulación. En los surimis CP2 elaborados con una combinación de crioprotectores

SA, SO y STPP se obtuvieron valores inferiores de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex*, pero en mayor medida en el lote 3 (NaHCO_3) cuya tendencia se mantuvo hasta el final de la conservación (C180). Si bien el efecto de los crioprotectores sobre los alérgenos de *Anisakis* no está del todo claro, la adición de STPP podría influir en una menor detección de alérgenos en los surimis, con distinto impacto en función del lote del que procedan, lo que implicaría una menor carga alérgica en los productos elaborados a partir de este tipo de surimis.

Durante la conservación en congelación de músculo de pescado, las proteínas miofibrilares se agregan y se produce una pérdida de solubilidad de la proteína del músculo, que incrementa con el tiempo de conservación y que dificulta o impide su extracción con las técnicas habituales (Tejada *et al.*, 1996; Careche *et al.*, 1998; Del Mazo *et al.*, 1999, Tejada, 2001). En músculo infestado conservado en congelación hasta 406 días se verificó que la formación de agregados proteicos no influía en la extracción y detección de Anis 4 (Apartado 5.2, Figuras 5.11 y 5.13), sin embargo, en surimis no se han encontrado estudios sobre el efecto de la congelación durante periodos largos en la detección de alérgenos. Con la finalidad de comprobar el posible efecto de la agregación de la proteína del músculo en la extracción de antígenos de *Anisakis* que pudiera enmascarar su detección, se realizó un 4º Control a los 300 días de conservación en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) para determinar la calidad de la proteína de los surimis medida como solubilidad proteica en soluciones salinas (%PS/PT).

En la Figura 5.42 se presenta la solubilidad proteica (% PS/PT) obtenida para cada lote y tipo de surimi. En todos los surimis la solubilidad dependió de la solución de lavado y tipo de crioprotector utilizado, evidenciándose diferencias significativas entre lotes y entre tipos de surimi con excepción del lote 1 y 4. La mayor solubilidad la alcanzaron los surimis del lote 4 (NaClO) no encontrándose diferencias significativas entre tipo de surimis en este lote. El efecto crioprotector de los polifosfatos (STPP) utilizados en los surimis CP2 se observó en los surimis de los lotes 2 y 4 (BF-Na y NaClO), mientras que la menor solubilidad se encontró en ambos tipos de surimi del lote 3 (NaHCO_3). Sin embargo, el porcentaje de solubilidad de la proteína en los lotes (Figura 5.42) no se correspondió con la detección de

alérgenos (Figura 5.41), por lo que consideramos que la menor detección de antígenos y alérgenos en los lotes congelados no está directamente unida a modificaciones en el músculo que puedan impedir su extracción.

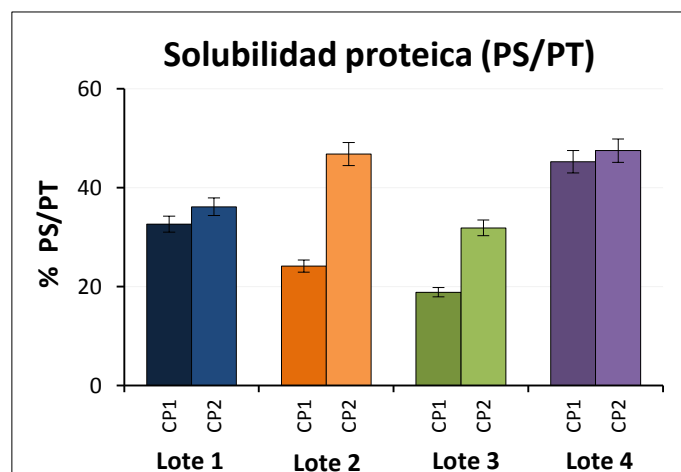


Figura 5.42 Solubilidad proteica (% PS/PT) de surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 300 días. **Lote 1:** H_2O ; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5 %; **Lote 4:** NaClO 20 ppm ; **ML:** Músculo después del 3º lavado; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%).

Para confirmar si la agregación de la proteína pudiera modificar la extracción en la técnica de inmunodetección empleada, el precipitado obtenido durante la extracción de la proteína para inmunodetección, se sometió a una digestión con pepsina en medio ácido con el fin de facilitar la extracción. Este procedimiento se había realizado en músculo refrigerado en estudios previos para valorar el porcentaje de proteína alergénica que pudiese quedar en el precipitado, extrayéndose en ese caso hasta un 90% de la proteína durante la digestión y no encontrándose diferencias entre la proteína alergénica obtenida antes y después de digerir durante 4 horas (Apartado 4.2).

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos indicar que el efecto de la conservación en congelación del surimi influyó en la detección de alérgenos de *Anisakis*, en especial a los correspondientes a Ani s 4 que fueron los que menor detección presentaron al final de la conservación en congelación (C180). Este comportamiento no se observó en la detección de Extracto crudo de *A. simplex* que sufrió un incremento significativo a los 90 días de conservación del surimi (C90).

El uso de diferentes combinaciones de crioprotectores tuvo poca incidencia en la detección de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex*, no encontrándose diferencias significativas entre tipos de surimi, sin embargo, dependiendo del lote y tiempo de conservación los surimis CP2 tuvieron la menor detección.

En los surimis el mayor efecto crioprotector se evidenció en los CP2 en cuya formulación se incluyó tripolifosfato de sodio (STPP) y aunque en todos los lotes se confirmó la formación de agregados proteicos por efecto de la congelación prolongada, su presencia no influyó en la detección de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex*.

5.3.5 Elaboración de geles y efecto de la conservación en congelación de geles

En los estudios realizados en sistemas modelo de esterilización de enlatados (Apartado 5.1) se ha demostrado que las proteínas alergénicas, incluso las que presentan gran resistencia térmica, pueden verse afectadas por acción del tratamiento térmico. Dadas las características de las proteínas alergénicas se ha considerado que durante el proceso de gelificación éstas podrían alterar su estructura de tal forma que se favorezca la pérdida de su actividad alergénica por formación de enlaces con otras proteínas del entorno o que su alergenicidad se incremente debido a la acción de la temperatura (90°C) que se emplea en la elaboración de geles. Asimismo, se ha considerado que el uso de compuestos antihelmínticos podrían modificar en cierta medida el comportamiento de los alérgenos en el producto final.

Tratamiento térmico y mecanismo de gelificación

La capacidad que tienen las proteínas del surimi para formar geles homogéneos y termoestables ha sido ampliamente estudiada desde hace décadas (Okada, 1963; Suzuki, 1981; Lee, 1984; Lanier, 1986). La solubilización parcial de las proteínas miofibrilares se produce al añadir sal e interaccionar con residuos ácidos y básicos de los aminoácidos. A medida que se van solubilizando las proteínas se desnaturalizan lo que permite una re-polimerización de la actomiosina por la interacción de la miosina con los filamentos de actina, que finalmente determina la gelificación (Niwa, 1992).

La formación del gel definitivo se consigue una vez solubilizada la proteína por la aplicación del tratamiento térmico aunque si este no se realiza, también se puede llegar a formar un gel utilizando temperaturas incluso de refrigeración durante tiempos prolongados (asentamiento) (Niwa, 1992). Dependiendo de la temperatura y de los tiempos empleados, se establecen los diferentes enlaces que dan lugar a la formación de geles con distintas características estructurales y texturales. Se considera que la textura final de un gel se debe a la formación de enlaces proteína-proteína, que se reagrupan durante el calentamiento final formando enlaces disulfuro

estables, interacciones secundarias e inclusive enlaces covalentes (Suzuki, 1981; Sano, 1988; Tsukamasa y Shimuzu, 1990).

Los puentes de hidrógeno se debilitan a elevadas temperaturas, lo que no siempre sucede con las interacciones hidrofóbicas que están fundamentalmente implicadas en la estabilización de la red cuando se enfría el gel (Alvarez, 1993). En cuanto al papel desempeñado por los puentes disulfuro se debe indicar que la formación de este tipo de enlaces esta más favorecida a elevadas temperaturas y a medida que aumenta la temperatura las interacciones por este tipo de enlaces pasan de ser intramoleculares a ser intermoleculares (Itoh *et al.*, 1979). La formación de enlaces termoestables es lo que le da a los geles finales su característica de termo-resistencia. La formación de enlaces con las proteínas alergénicas podría influir en la disminución de alergenicidad cuando el músculo o surimi infestado se somete al proceso de gelificación.

Adición de ingredientes larvicidas en la formulación del gel

Diversos estudios han considerado el uso de compuestos naturales de origen vegetal como aditivo alimentario para la profilaxis en contra de la anisakiosis (Navarro *et al.*, 2008; 2010). Entre los compuestos con actividad larvicida más estudiados tenemos al [6]-shogaol y [6]-gingerol, extraídos de las raíces del jengibre (*Zingiber officinale*) (Goto *et al.*, 1990; Lin *et al.*, 2010), o algunos derivados monoterpénicos extraídos de aceites esenciales de plantas, como el citral, geraniol, carvacrol, eugenol, entre otros (Hierro *et al.*, 2004; 2006; Valero *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2008).

Se ha demostrado que el citral actúa como un antihelmíntico eficaz, llegando a producir el 100% de mortalidad en larvas a las 4 horas de exposición y que a concentraciones menores a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no producen alteraciones en la cutícula (Hierro *et al.*, 2004), aunque esto dependerá de las condiciones de tratamiento y de la larva.

5.3.5.1 Objetivos

Los objetivos planteados en esta parte del proceso (Etapa IV del proceso general de obtención de surimi y geles, Figura 5.16) fueron:

- Evaluar el efecto en la extracción y detección de alérgenos de *Anisakis* de la solubilidad con sal y el tratamiento térmico utilizados en el proceso de elaboración de geles.
- Evaluar el efecto sobre los alérgenos de *Anisakis* al utilizar compuestos con acción larvicida en la formulación de geles.
- Evaluar el comportamiento de los alérgenos de *Anisakis* en geles conservados en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta 180 días.

5.3.5.2 Diseño del experimento

En las Figuras 5.43 y 5.44 se representan el esquema general de la elaboración de geles y el esquema del tratamiento realizado en geles congelados. Algunas imágenes del proceso se presentan la Figura 5.45.

5.3.5.2.1 Obtención y elaboración de muestras de trabajo

Elaboración de geles

En el Apartado 5.3.4 se describe el proceso de elaboración y conservación de surimis utilizados en esta etapa. Los geles fueron elaborados a partir de surimis refrigerados (R) ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$, 1 día) y conservados en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 90 y 180 días (C90 y C180). Todo el proceso se realizó en las instalaciones del ICTAN. Los lotes de surimis congelados se atemperaron a $5\pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas o hasta alcanzar una temperatura de $\leq 1^{\circ}\text{C}$. Se elaboraron 12 tipos de geles de cada tipo de surimi en función de su conservación en refrigeración o congelación (90 ó 180 días), siguiendo el esquema de la Figura 5.44.

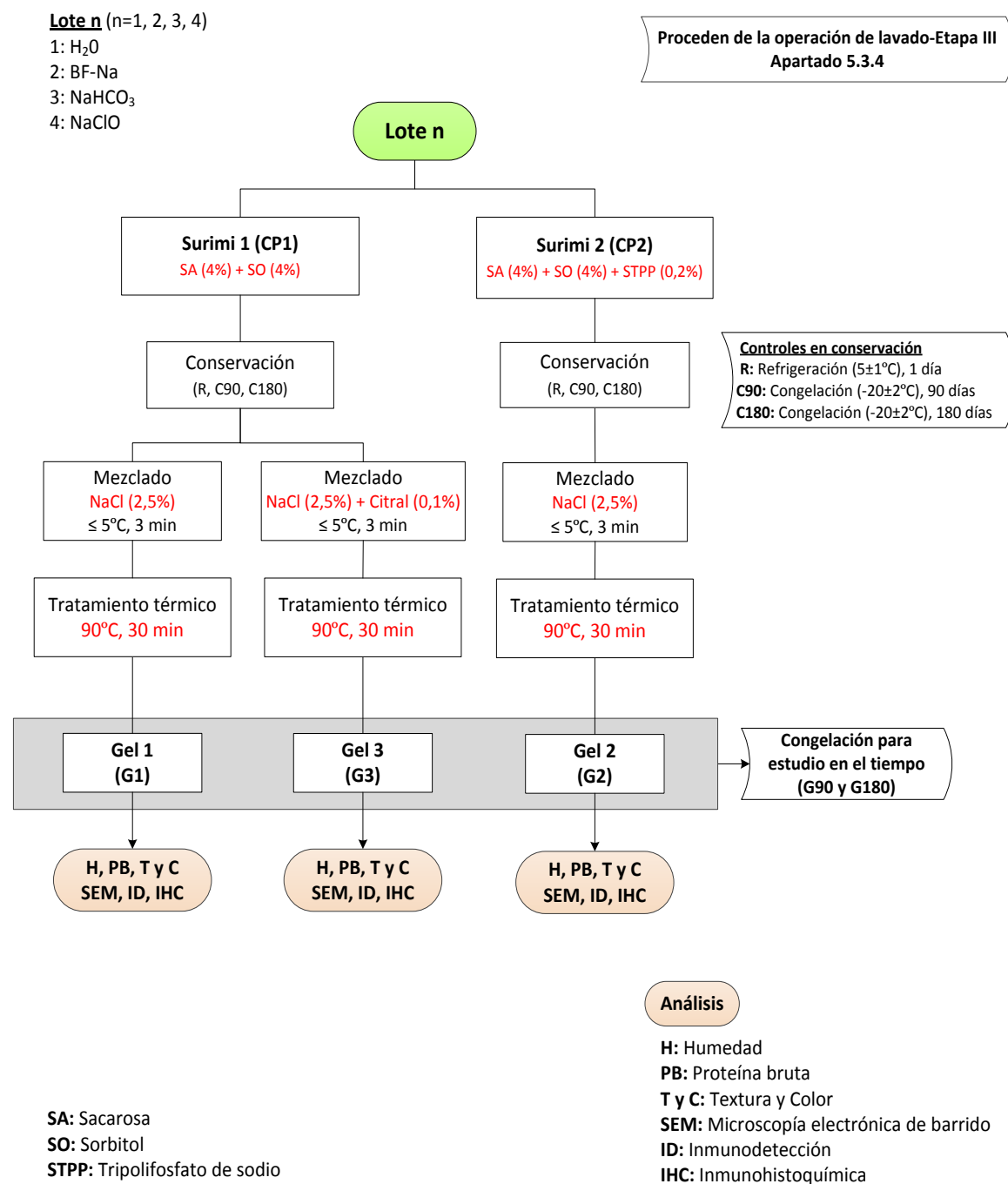


Figura 5.43 Diseño experimental del tratamiento aplicado a los geles elaborados con surimis refrigerados (5±1°C) y surimis conservados en congelación (-20±2°C) durante 90 y 180 días obtenidos en la etapa anterior (Apartado 5.3.4).

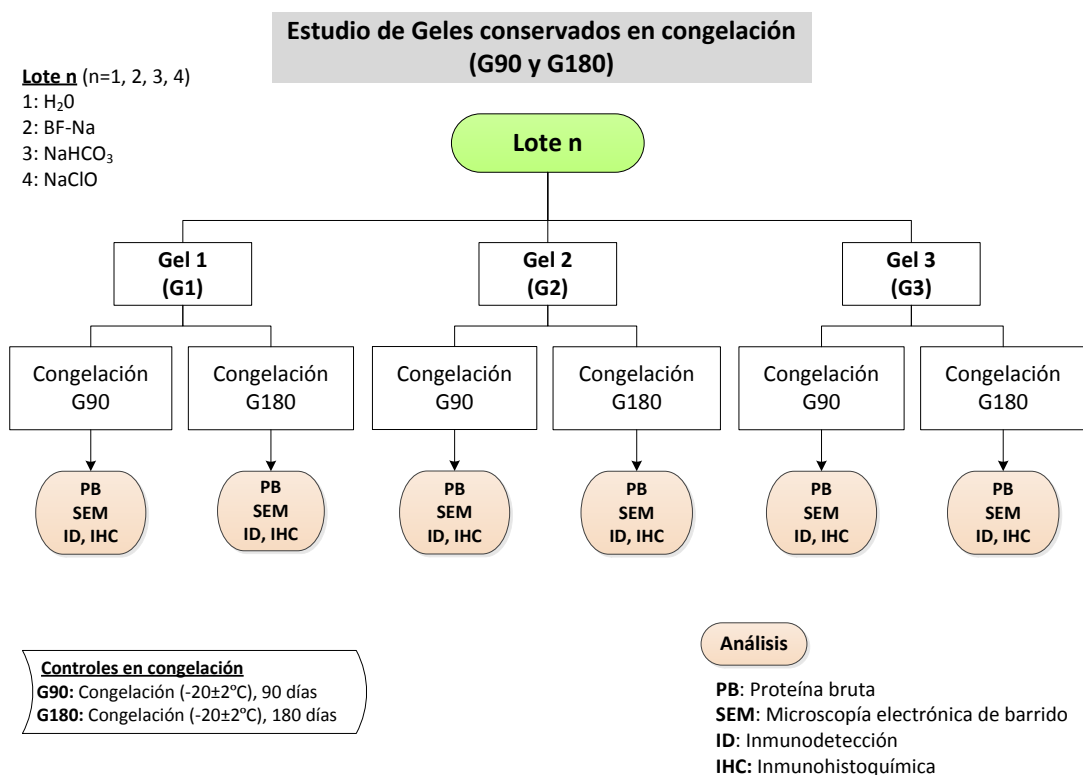


Figura 5.44 Esquema general del estudio de geles elaborados con surimis refrigerados (5±1°C, 1 día) y surimis conservados en congelación (-20±2°C) durante 90 y 180 días.

Elaboración de geles



En laboratorio

Figura 5.45 Imágenes de la etapa de elaboración de geles.

Para cada lote de solución de lavado se obtuvieron 3 tipos de geles (G1, G2 y G3). Los geles 1 y 3 se elaboraron con surimis 1 (CP1) y el gel 2 a partir de surimis 2 (CP2). Por cada 100 g de surimi se añadió 2,5 g de cloruro sódico (Alvarez, 1993) y sólo para el gel 3 (G3) se añadió 0,1 g de Citral (Cis+Trans 95%, Alfa Aesar GmbH & Co KG, Alemania) con la finalidad de evaluar el efecto de los terpenos en los alérgenos de *Anisakis*.

Lote n (n=1, 2, 3, 4)

Gel 1 (G1): Surimi 1 (CP1) + NaCl (2,5%)

Gel 2 (G2): Surimi 2 (CP2) + NaCl (2,5%)

Gel 3 (G3): Surimi 1 (CP1) + NaCl (2,5%) + Citral (0,1%)

El mezclado se realizó en una batidora-picadora (Hand processor accesory, Minipimer 5, Braun GmbH) a velocidad 1 y durante 3 minutos o hasta conseguir una masa homogénea. Durante todo el proceso se controló que la temperatura no superara los 5°C. Posteriormente, la masa obtenida fue colocada en cilindros individuales de acero inoxidable de 30 mm de diámetro y 30 mm de altura. Durante el moldeado se procuró evitar la formación de burbujas de aire en la masa y los cilindros fueron cerrados herméticamente mediante rosca con junta de goma, lo que evitó modificaciones de volumen y entrada de agua durante el tratamiento térmico.

El tratamiento térmico de los geles se realizó en horno (Horno Rational Combi-Master CM6, Alemania) con vapor saturado a 90°C durante 30 minutos (Alvarez, 1993). Una vez obtenidos los geles se enfriaron en hielo y agua y se mantuvieron en refrigeración ($5\pm1^{\circ}\text{C}$, ≤ 2 horas) hasta la realización de los análisis correspondientes.

Parte de los geles elaborados con surimis refrigerados (R) se conservaron en congelación ($-20\pm2^{\circ}\text{C}$) para su posterior estudio en el tiempo a los 90 y 180 días (G90 y G180), tal como se especifica en las Figuras 5.43 y 5.44.

5.3.5.2.2 Análisis de las muestras de trabajo

En todos los geles se evaluó el porcentaje de humedad (Apartado 3.2.2.1) y proteína bruta (Apartado 3.2.2.2) y se determinó el pH (Apartado 3.2.2.5).

Evaluación de textura y color en geles

Se siguió el protocolo descrito en el Apartado 3.2.4.

Microscopia electrónica de barrido (SEM)

La técnica se aplicó a muestras de geles seleccionadas de los distintos lotes estudiados (Apartado 3.2.5).

Extracción e inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

La inmunodetección por DB (Apartado 3.2.6.2) se realizó en todas las muestras de geles, mientras que IHC (Apartado 3.2.6.3) se aplicó a muestras seleccionadas del lote 1 (H₂O).

Dadas las características estructurales de los geles y con la finalidad de liberar con mayor eficacia las proteínas antigénicas, se modificaron las condiciones de sonicación durante la aplicación de la técnica de extracción para ID. Los parámetros de sonicación utilizados fueron 30 W durante 120 segundos y se seleccionaron teniendo en cuenta los estudios realizados previamente (Apartado 4.1). En todo momento se controló que la temperatura no fuera superior a 5°C.

5.3.5.2.3 Análisis estadístico

El análisis estadístico aplicado se describe en el Apartado 3.3. En el caso de las muestras para inmunohistoquímica (IHC), el área de estándar (Sa) para todas las micrografías fue 1,65083948 μm^2 .

5.3.5.3 Resultados y discusión

5.3.5.3.1 Composición de los geles

En la Tabla 5.10 se presentan el porcentaje de humedad y proteína y valores de pH de geles elaborados a partir de surimi refrigerado (R). En cada control se verificaron estos componentes y no se evidenciaron diferencias significativas de humedad en geles elaborados con surimi conservados en congelación.

Tabla 5.10 Porcentaje (%) de humedad y proteína y valores de pH de geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$, 1 día).

Lote		Humedad (%)	Proteína (%)	pH
1	G1	$79,70 \pm 0,02^a$	$9,57 \pm 0,05^a$	$7,06 \pm 0,02^a$
	G2	$79,60 \pm 0,14^a$	$9,37 \pm 0,04^a$	$6,88 \pm 0,01^a$
	G3	$80,04 \pm 0,04^a$	$9,75 \pm 0,06^a$	$6,76 \pm 0,01^a$
2	G1	$79,52 \pm 0,14^a$	$10,29 \pm 0,09^a$	$7,02 \pm 0,04^a$
	G2	$79,32 \pm 0,06^a$	$10,67 \pm 0,09^a$	$7,27 \pm 0,04^a$
	G3	$79,69 \pm 0,15^a$	$10,11 \pm 0,36^a$	$6,81 \pm 0,02^a$
3	G1	$79,37 \pm 0,14^a$	$9,58 \pm 0,03^a$	$7,84 \pm 0,04^b$
	G2	$79,13 \pm 0,03^a$	$9,34 \pm 0,13^a$	$7,74 \pm 0,12^b$
	G3	$79,51 \pm 0,06^a$	$9,61 \pm 0,08^a$	$7,93 \pm 0,03^b$
4	G1	$81,27 \pm 0,14^a$	$10,03 \pm 0,03^a$	$7,11 \pm 0,01^a$
	G2	$80,54 \pm 0,03^a$	$10,41 \pm 0,06^a$	$6,85 \pm 0,07^a$
	G3	$79,51 \pm 0,06^a$	$10,02 \pm 0,18^a$	$6,92 \pm 0,07^a$

Lote 1: H₂O; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO₃ 0,5 %; **Lote 4:** NaClO 20 ppm; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%); **G1:** Gel 1 (CP1); **G2:** Gel 2 (CP2); **G3:** Gel 3 (CP1 + Citral 0,1%). Letras diferentes (a, b) en la misma columna significan diferencias entre lotes ($p < 0,05$).

El contenido de humedad en los geles (G1, G2 y G3) osciló entre un 79 y 81%, no encontrándose diferencias significativas entre lotes, tipos de geles y tiempo de conservación del surimi del que fueron elaborados.

El porcentaje de proteína estuvo alrededor del 10% y las diferencias no fueron significativas entre los geles elaborados con distinto tipo de surimi. Posteriormente en el Apartado 5.3.5.3.4 (Figura 5.52) se presentará gráficamente y se discutirá el comportamiento del porcentaje de proteína en los geles elaborados con surimi conservado en congelación (C90 y C180).

Los valores de pH se mantuvieron en valores inferiores a 7,5 excepto en los geles del lote 3 (NaHCO_3) que fueron significativamente superiores y coincidió con un mayor valor de pH del músculo (ML) durante la etapa de lavados sucesivos (Tabla 5.10).

5.3.5.3.2 Evaluación de textura y color en geles

El objetivo principal del trabajo fue evaluar el comportamiento de los alérgenos de *Anisakis* en el proceso de elaboración de geles teniendo en cuenta las distintas condiciones empleadas: soluciones de lavado, ingredientes añadidos, solubilidad en el amasado con sal y tratamiento térmico. Los geles se elaboraron en el laboratorio debido a la pequeña cantidad de muestra necesaria para el estudio de cada tipo de gel, por lo que no pudieron hacerse en las condiciones de vacío que se utilizan en planta piloto, necesarias para la obtención de un gel con la textura adecuada. No obstante se determinó textura y color como índices de calidad de los geles obtenidos.

Textura

En la Figura 5.46 se muestran los resultados de resistencia del gel (RG), fuerza de rotura (FR) y deformación de rotura (DR) de los tres tipos de geles correspondientes a diferentes los lotes estudiados.

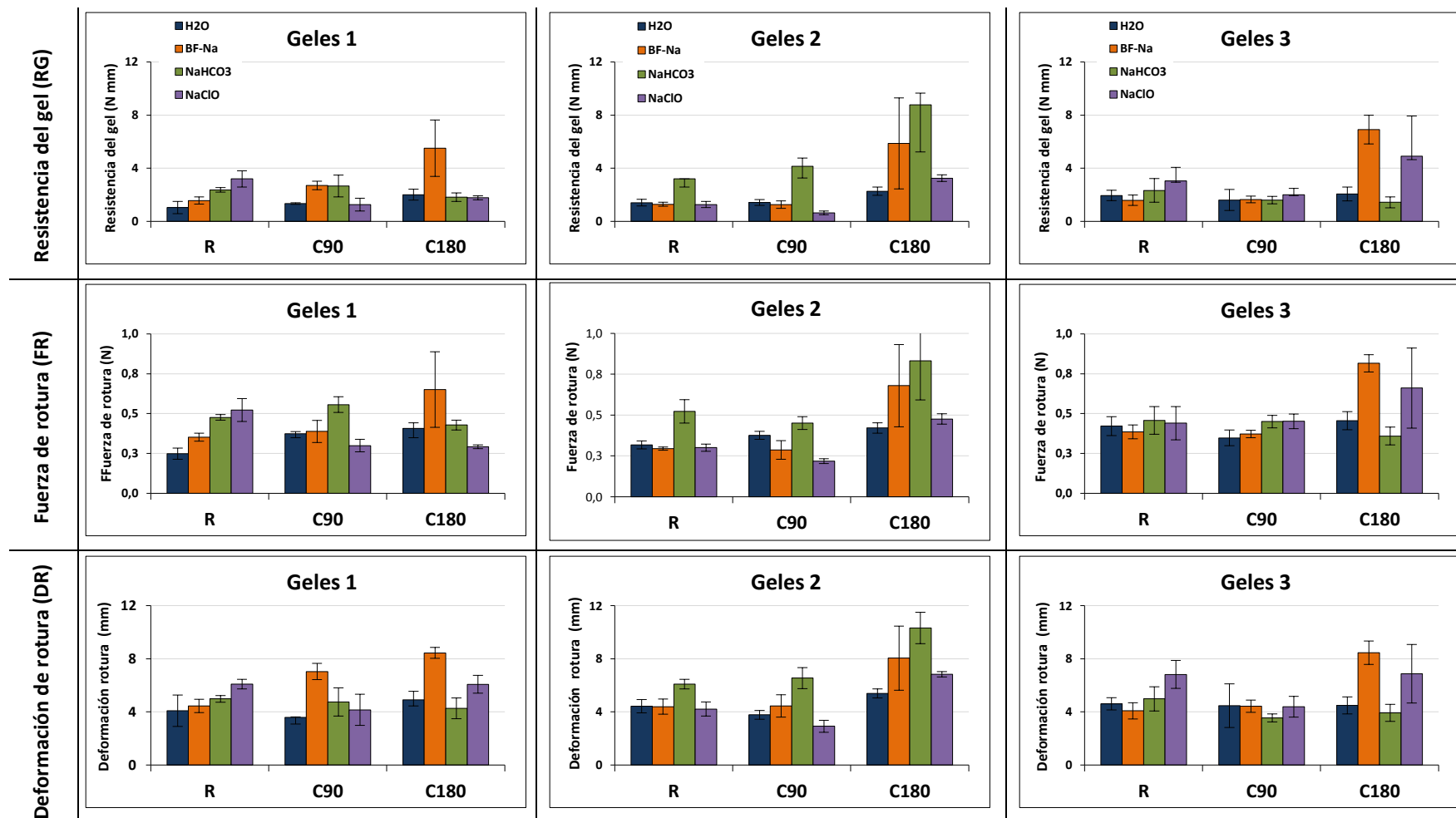


Figura 5.46 Resistencia (N mm), Fuerza de rotura (N) y Deformación de rotura (mm) de geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$, 1 día) y surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 90 y 180 días. **Lote 1:** H₂O; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO₃ 0,5 %; **Lote 4:** NaClO 20 ppm; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%); **G1:** Gel 1 (CP1); **G2:** Gel 2 (CP2); **G3:** Gel 3 (CP1 + Citral 0,1%). **Tiempo de conservación del surimi:** R-Refrigeración; C90-Congelación 90 días; C180-Congelación 180 días.

Para los geles elaborados con surimi refrigerado (R), entre los geles G1 y G2 las diferencias en la RG por efecto de la adición de STPP en el G2, se observaron en los lotes 3 y 4 (NaHCO_3 y NaClO), sin embargo la menor RG la presentó el G2 del lote 4. Entre geles G1 y G3 no se encontraron diferencias significativas en la RG de ninguno de los lotes.

En el estudio de geles elaborados con surimi congelado durante 90 días (C90), dependiendo del lote las diferencias en la RG entre geles fueron significativas respecto a los geles elaborados con surimi refrigerado (R). Entre tipo de geles, los geles G2 del lote 3 (NaHCO_3) fueron los que presentaron una mayor RG respecto a los geles G1, mientras que entre G1 y G3 las diferencias fueron significativas en los correspondientes G3 de los lotes 2 y 3 (BF-Na y NaHCO_3) que presentaron una disminución en la RG respecto a los G1.

En los geles elaborados con surimi congelado durante 180 días (C180), sólo en los G2 de los lotes 3 y 4 (NaHCO_3 y NaClO) se observó un aumento significativo en la RG respecto a los G1, mientras que entre los geles G1 y G3 las diferencias las presentaron los G3 del lote 4 (NaClO), en los que la adición de citral en el surimi incrementó significativamente la RG.

En general, el uso de tripolifosfato de sodio (STPP) en la formulación de los surimis CP2 se reflejó en un aumento en la RG de los geles G2 del lote 3 (NaHCO_3) y estuvo directamente relacionado con el tiempo de congelación del surimi del que fueron elaborados los geles. El efecto de la adición del citral en los geles G3 fue más evidente en la RG de los G3 del lote 4 (NaClO).

Aunque la humedad del surimi incide en la textura del gel disminuyendo la RG a medida que aumenta el contenido de agua (Lee, 1984; Hamann, 1990), en los geles elaborados en este estudio, la humedad no presentó en ningún caso diferencias significativas, manteniéndose en niveles alrededor del 80% (Tabla 5.10). Todos los geles se formaron por tratamiento térmico directo a igual tiempo y temperatura (90°C, 30 min) (Alvarez *et al.*, 1995) por lo que las diferencias encontradas en DR, FR y RG

entre algunos geles elaborados con surimis refrigerados o conservados en congelación (C90 y C180), fueron debido principalmente al efecto que el tipo de lavado y los ingredientes utilizados en la elaboración del surimi o geles pudieron ejercer durante la conservación o el tratamiento térmico aplicado.

Color

Los resultados de las medidas de color están representados en la Figura 5.47, mientras que en la Figura 5.48 se presentan las imágenes de los diferentes geles obtenidos en el estudio.

Los valores de luminosidad (L^*) no presentaron diferencias entre tipo de geles o lotes y evidenció el mismo comportamiento a lo largo del tiempo de conservación de los surimis de los que fueron elaborados (R, C90 y C180), excepto los geles del lote 4 (NaClO) elaborados con surimi congelado durante 90 días (C90), en el que la luminosidad disminuyó abruptamente.

Los valores de a^* apenas mostraron diferencias entre lotes de geles G1 y G2 elaborados con surimi refrigerado (R), y en el caso de los geles G3 las diferencias sólo fueron significativas en los G3 del lote 3 (NaHCO_3). En todos los lotes, los G2 presentaron un aumento significativo en el valor de a^* respecto a los G1, mientras que entre los G1 y G3 se observó que en los G3 que incluían citral en su formulación, los valores de a^* disminuyeron significativamente respecto a los G1, lo que implicó un aumento en la tendencia al color verde en este tipo de geles.

En geles elaborados con surimi congelado durante 90 días (C90), en la mayoría de los casos las diferencias en los valores de a^* entre lotes de geles no fueron significativas respecto al tiempo de conservación del surimi (R), con excepción de los geles del lote 4 que presentaron una desviación en su comportamiento que se reflejó en valores de a^* superiores al resto de geles. Las diferencias entre los geles G1 y G2 elaborados con distinto tipo de surimi no fueron significativas, mientras que entre los G1 y G3 se observó una disminución significativa de los valores de a^* en todos los lotes de G3 respecto a los G1.

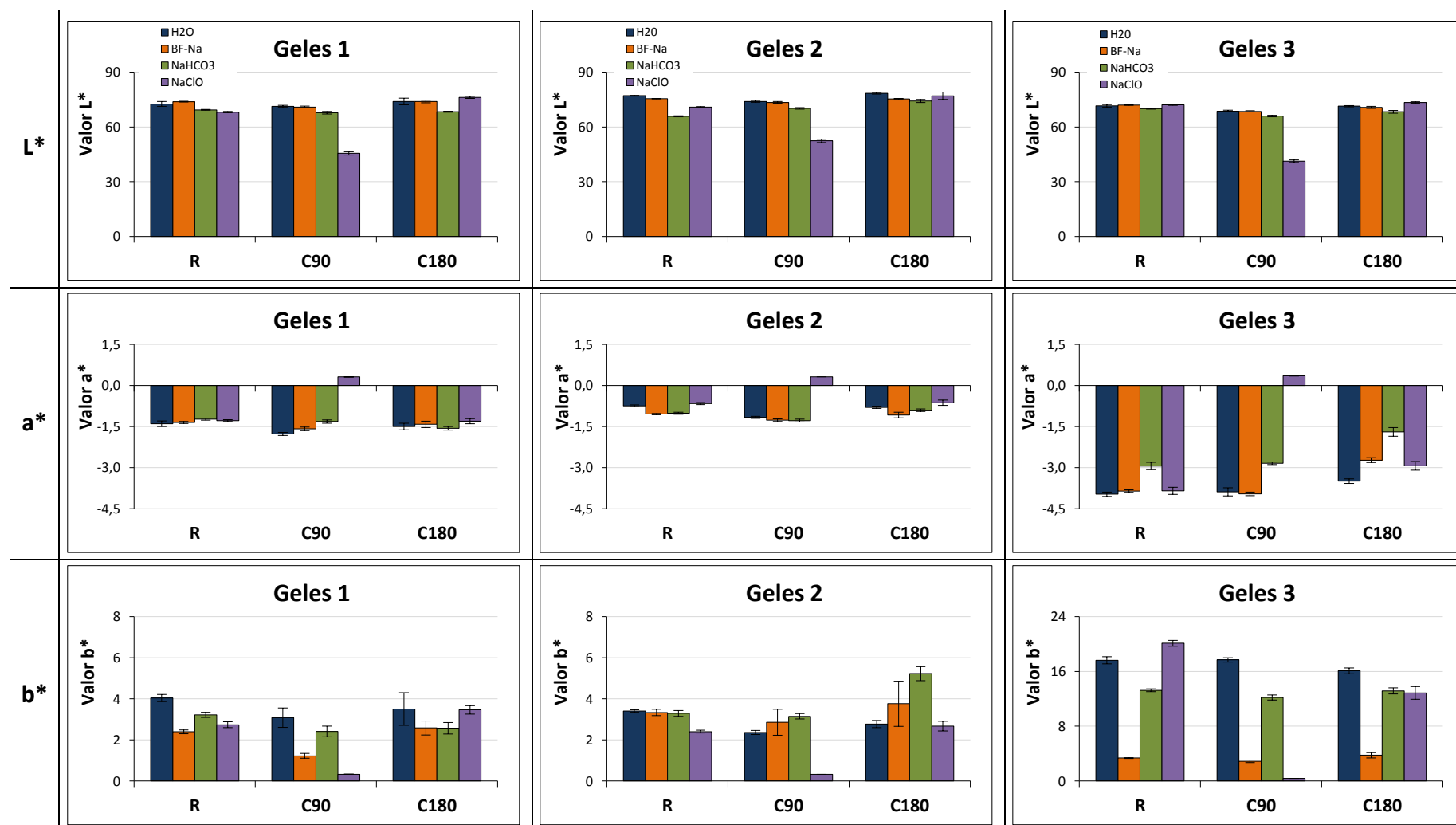


Figura 5.47 Color (L^* , a^* , b^*) de geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 1 día) y surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 90 y 180 días. **Lote 1:** H_2O ; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5 %; **Lote 4:** NaClO 20 ppm; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%); **G1:** Gel 1 (CP1); **G2:** Gel 2 (CP2); **G3:** Gel 3 (CP1 + Citral 0,1%). **Tiempo de conservación del surimi:** **R**-Refrigeración; **C90**-Congelación 90 días; **C180**-Congelación 180 días.

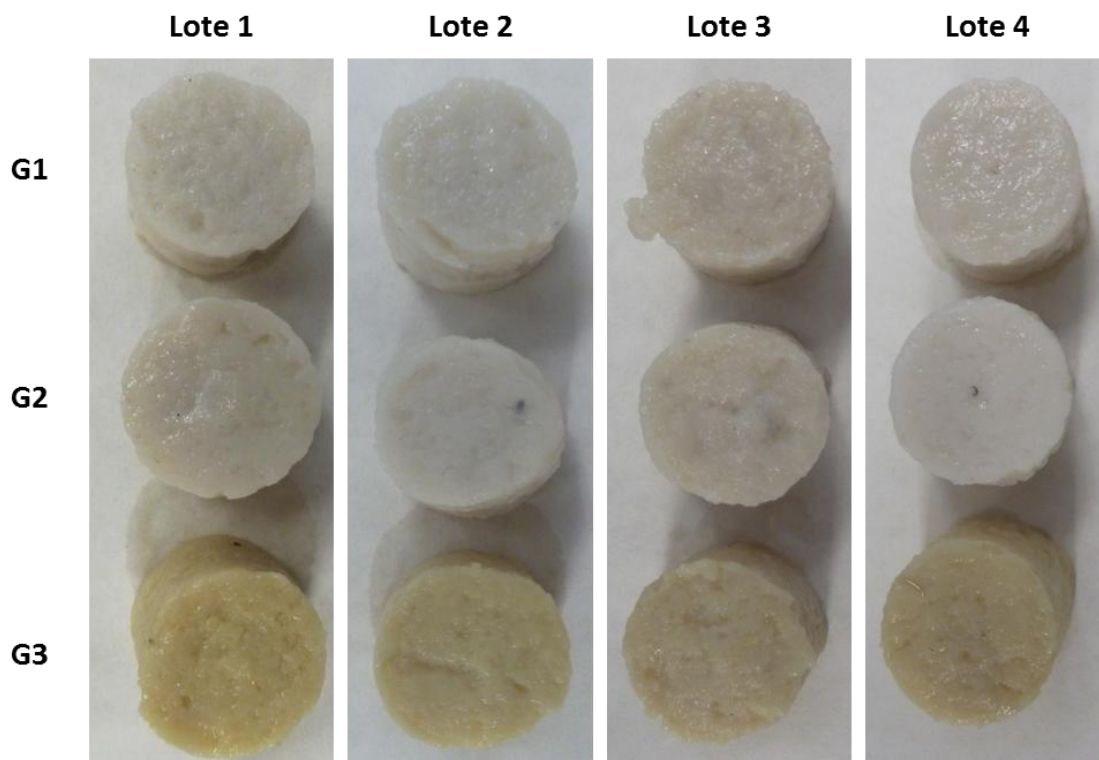


Figura 5.48 Imágenes de geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$, 1 día) .
Lote 1: H_2O ; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5 %; **Lote 4:** NaClO 20 ppm;
CP1: Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%);
G1: Gel 1 (CP1); **G2:** Gel 2 (CP2); **G3:** Gel 3 (CP1 + Citral 0,1%).

En los geles G1 y G2 elaborados con surimi congelado durante 180 días (C180), con excepción de los geles del lote 4, los valores de a^* presentaron el comportamiento observado en los geles C90. En los G3 dependiendo del lote y del tiempo de conservación del surimi las diferencias en los valores de a^* fueron significativas. En los geles G2 se observó un aumento del valor de a^* respecto a los G1, mientras que entre G1 y G3 se observó una disminución significativa en el valor de a^* de los G3 respecto a los G1, debido principalmente a la adición del citral en su formulación.

Los valores de b^* en geles elaborados con surimi refrigerado (R) variaron entre tipo de geles y lotes. Entre geles G1 y G2 las diferencias significativas dependieron del lote, aunque el menor valor b^* lo presentó el G2 del lote 4 respecto al G1. Entre geles G1 y G3 las diferencias en los valores de b^* fueron significativas en todos los lotes.

Todos los geles elaborados con surimi congelado durante 90 días (C90) presentaron diferencias significativas entre lotes y tiempo de conservación del surimi (R). Entre los G1 y G2 elaborados con distinto tipo de surimi, las diferencias en el valor b^* fueron significativas, excepto en los geles del lote 4 (NaClO). Entre los G1 y G3 las mayores diferencias se obtuvieron por la adición del citral en el G3. En todos los geles obtenidos en el lote 4 (NaClO) de surimi congelado 90 días se encontró una disminución abrupta de los valores de b^* .

En geles elaborados con surimi congelado 180 días (C180), las diferencias entre tipo de geles dependieron del lote y en la mayoría de los casos fueron significativas respecto al tiempo de conservación del surimi del que fueron elaborados (R y C90). Entre geles G1 y G2 se observaron diferencias significativas en el valor b^* de los G2 de los lotes 2 y 4 respecto a G1, mientras que entre G1 y G3 nuevamente las mayores variaciones se observaron en los G3 respecto a los G1.

En todos los lotes la presencia de citral en los geles G3 motivó que los valores de b^* fueran superiores a 5, obteniendo valores máximos que quintuplican los obtenidos en los geles G1. Este aumento fue menor en los G3 obtenidos con el lote 2 (BF-Na).

Los resultados indican que el color amarillo observado visualmente en los G3 debido a la adición de citral se manifiesta en la modificación de los valores de a^* y b^* , características que varían dependiendo del lote y en algunos casos del tiempo de conservación de los surimis de los que fueron elaborados los geles. No se encontró una explicación que pueda justificar a la modificación de los valores de L^* , a^* y b^* observados en el lote 4 (NaClO) en los geles hechos con surimi conservado 90 días en congelación (C90).

5.3.5.3.3 Microscopia electrónica de barrido (SEM)

En las micrografías presentadas en la Figura 5.49 se observan claramente las diferencias estructurales entre surimi y geles del lote 1 (H₂O). En el surimi se observa que aún se sigue conservando a estructura del músculo, mientras que en los geles las proteínas miofibrilares se encuentran formando redes elásticas y firmes, que dependiendo del tratamiento térmico aplicado pueden estar unidas por enlaces proteína-proteína, interacciones hidrofóbicas, puentes hidrógeno o enlaces S-S estables (Suzuki, 1981; Niwa, 1985; Tejada, 1994). En nuestro estudio significó la modificación de las condiciones de sonicación utilizadas en la técnica de extracción para ID, condiciones que fueron establecidas en trabajos preliminares (no mostrados) y que se seleccionaron teniendo en cuenta los resultados obtenidos al modificar los parámetros de sonicación en la extracción de las proteínas por inmunodetección (Apartado 4.1).

LOTE 1: H₂O

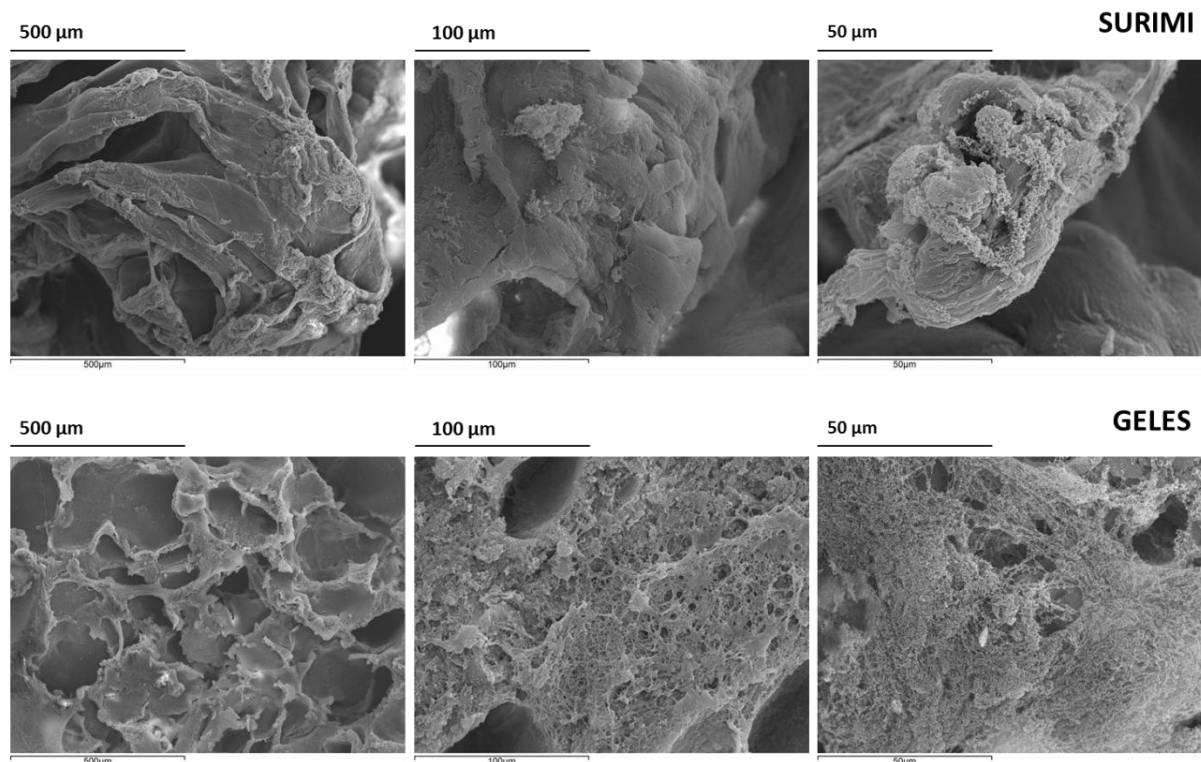


Figura 5.49 Diferencias estructurales observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) entre surimi y geles del lote 1 (H₂O).

En la Figura 5.50 se presentan imágenes de microscopia electrónica de barrido (SEM) de los geles 1 (G1) elaborados con surimi congelado a $-20\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 90 y 180 días (C90 y C180).

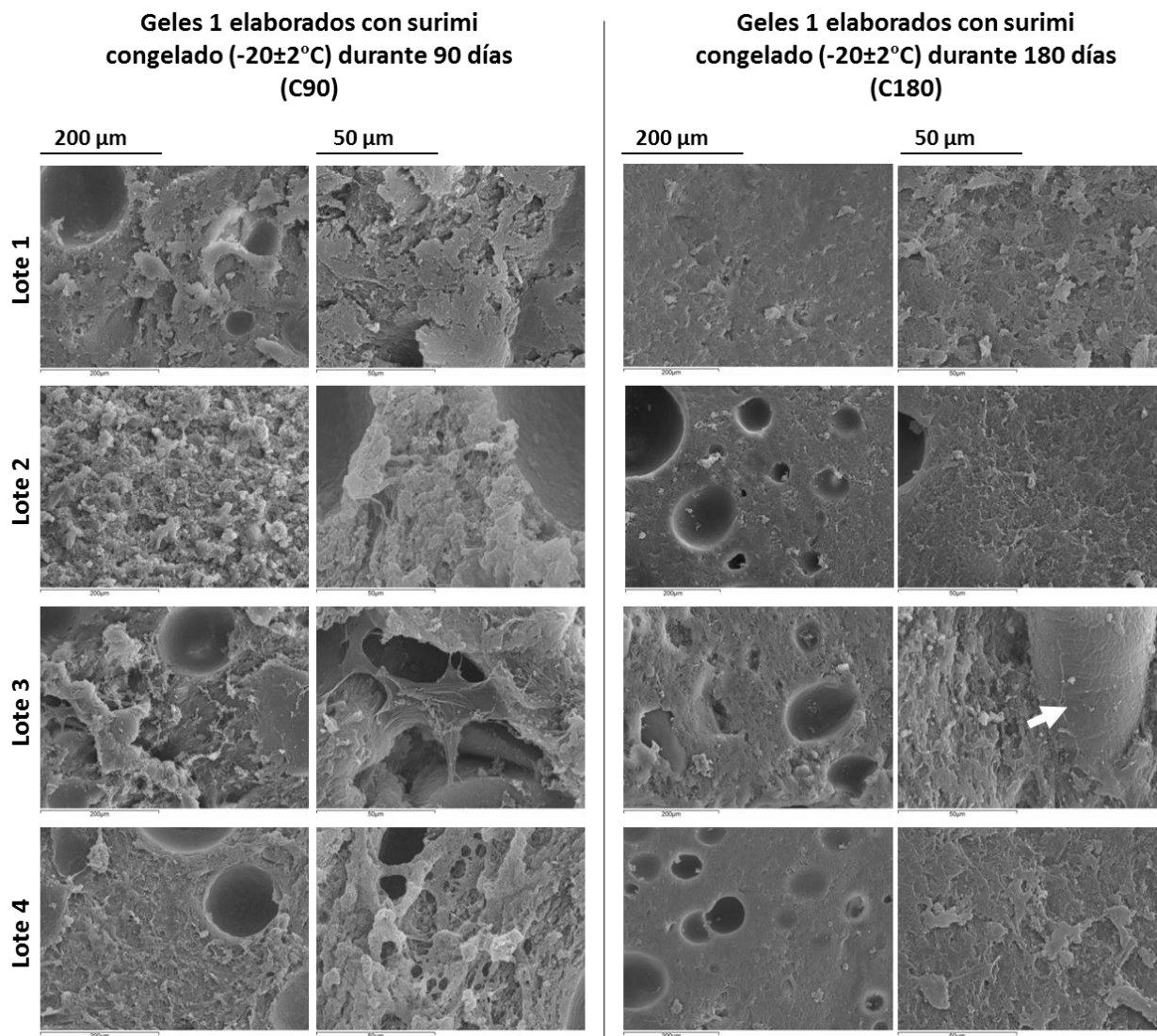


Figura 5.50 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de geles 1 (G1) elaborados con surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 90 y 180 días (C90 y C180). **Lote 1:** H_2O ; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5 %; **Lote 4:** NaClO 20 ppm; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **G1:** Gel 1 (CP1). La flecha indica la posición de la larva.

En las micrografías podemos observar que las muestras exhiben zonas compactas de espesor variable, correspondientes a las redes formadas por las proteínas miofibrilares al formar el gel tipo *kamaboko*, y por otro lado observamos cavidades producidas por la presencia de burbujas de aire que no se eliminaron en el momento del moldeado. Al respecto, debemos considerar que la elaboración de los geles se realizó en el laboratorio a menor escala, razón por la cual en la operación de mezclado con sal no se utilizó una mezcladora al vacío por lo que encontramos estructuras más porosas que en geles elaborados a vacío.

La estructura más compacta que se observa en el lote 2 (BF-Na) a los 180 días (Figura 5.50 a 50 μm) se corresponde con un incremento de la RG en este lote, descrita anteriormente. En los otros lotes se aprecian apenas diferencias en la estructura de la red debido a la utilización de surimi con un mayor periodo de conservación en congelación. Modificaciones en la estructura que se corresponden con modificaciones en textura han sido anteriormente descritas (Alvarez, 1993; Alvarez *et al.*, 1995).

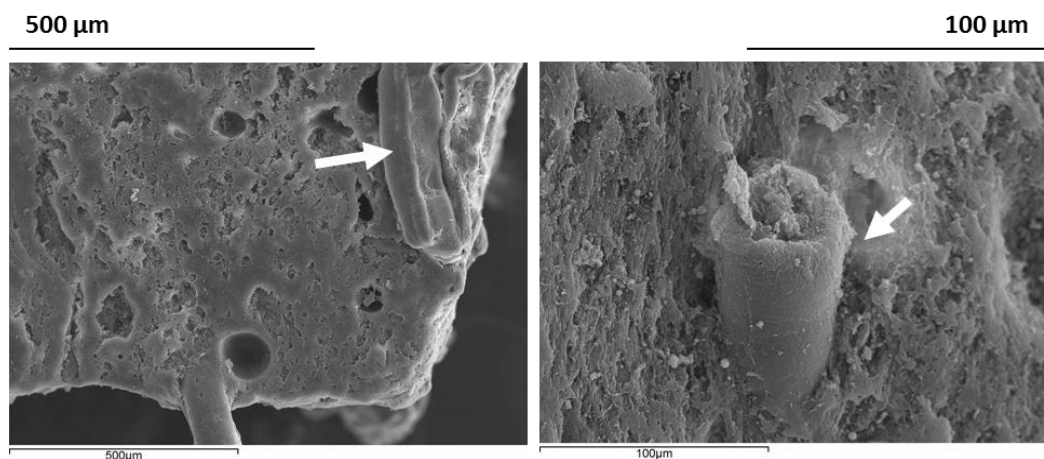


Figura 5.51 Larvas de *A. simplex* s.s. observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) en una muestra del gel 1 (G1) elaborado con surimi del lote 3 (NaHCO_3) congelado a $-20\pm 2^\circ\text{C}$ durante 180 días. Las flechas indican la posición de las larvas.

En las micrografías obtenidas de geles elaborados con surimi congelado durante 180 días (C180) se observó la presencia de larvas de *Anisakis* en el gel del lote 3 (NaHCO_3) (Figura 5.50 micrografía tomada a $50\ \mu\text{m}$ y en la Figura 5.51). A pesar de que el músculo infestado fue extrusionado a través de un tambor con orificios de 3,0 mm de diámetro quedando parte de las larvas retenidas en el tambor (Apartado 5.3.1), este diámetro permitió el paso de larvas al músculo, ya que en medidas realizadas en las micrografías obtenidas por SEM de los distintos lotes estudiados, se determinó que el diámetro medio de las larvas utilizadas osciló entre 0,1-0,15 mm. Como se observa en las micrografías, la apariencia de las larvas apenas se modifica en la conservación en congelación del surimi y el procesado de los geles.

La operación de refinado, no realizada en el presente trabajo, permitiría una mayor retención, aunque debido al diámetro de los orificios normalmente utilizados en la refinadora (1,0-1,7 mm de diámetro) también permite el paso de larvas al surimi.

5.3.5.3.4 Efecto de las condiciones de elaboración de geles en la detección de alérgenos de *Anisakis*

El objetivo de esta parte del estudio fue evaluar el efecto de las soluciones de lavado, adición de polifosfatos o citral, y el tratamiento térmico en la pérdida o reducción de la alergenicidad de geles elaborados con surimis refrigerados (R) y conservados en congelación durante 90 y 180 días (C90 y C180).

En la Figura 5.52 se presenta el contenido de proteína (%) y la cantidad de alérgenos de *Anisakis* 4 y Extracto crudo *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) detectados en geles (G1, G2 y G3) elaborados con surimis refrigerados (R) y surimis conservados en congelación (C90 y C180). En todos los lotes el contenido de proteína se mantuvo sin variación con respecto a los surimis de los que fueron elaborados. El porcentaje de proteína de los geles osciló entre 9 y 11% y no se encontraron diferencias significativas en el tiempo de conservación del surimi, ni entre lotes. Este análisis se realizó con la finalidad de verificar las posibles variaciones del porcentaje de proteína por efecto de la congelación prolongada del surimi del que fueron elaborados.

GELES (G1, G2 y G3)

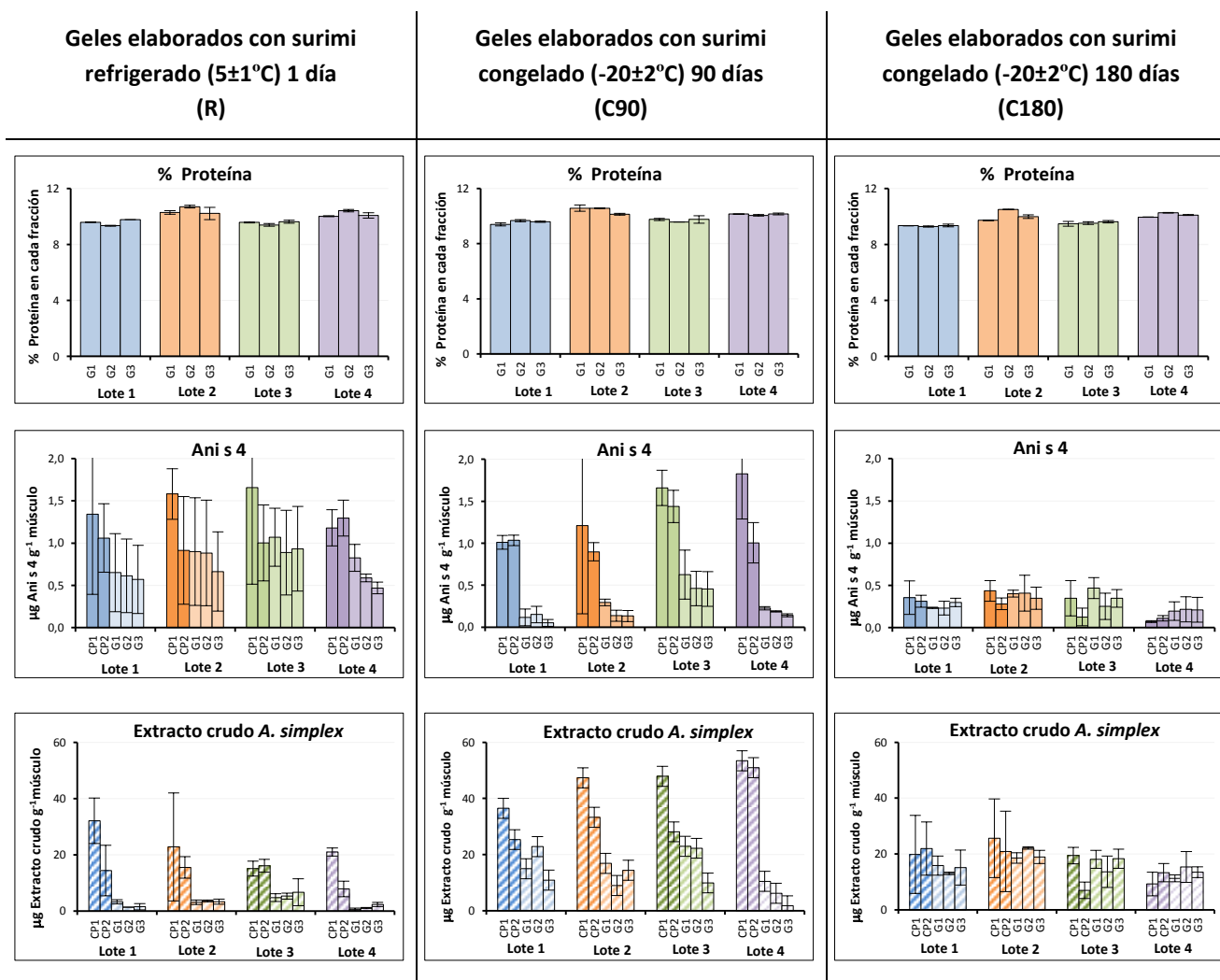


Figura 5.52 Porcentaje de proteína (%) y cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) de geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 1 día) y surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 90 y 180 días. **Lote 1:** H_2O ; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5%; **Lote 4:** NaClO 20 ppm; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%); **G1:** Gel 1 (CP1); **G2:** Gel 2 (CP2); **G3:** Gel 3 (CP1 + Citral 0,1%). **Tiempo de conservación del surimi:** **R**-Refrigeración; **C90**-Congelación 90 días; **C180**-Congelación 180 días.

Inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

- Ani s 4

Durante el estudio de geles elaborados con surimi refrigerado (R), los G1 y G3 evidenciaron una disminución respecto al surimi del que partieron (CP1), mientras que en los geles G2 elaborados a partir de surimi CP2, sólo mostraron diferencias los geles correspondientes a los lotes 1 y 4 (H₂O y NaClO). Entre lotes y tipo de geles no se evidenciaron diferencias significativas, aunque la menor detección se obtuvo en los tres tipos de geles elaborados con los lotes 1 y 4 (H₂O y NaClO). En los geles G1 no se observaron diferencias significativas entre lotes, aunque la mayor detección la obtuvo el G1 del lote 3 (NaHCO₃). Entre los geles G1 y G2, elaborados con surimis refrigerados en los que se le adicionó polifosfatos en el G2, se detectó una disminución de Ani s 4 en los geles G2 del lote 4 (NaClO) aunque las diferencias no fueron significativas respecto a los G2 de los otros lotes; mientras que entre los geles G1 y G3, elaborados con el mismo tipo de surimi pero con adición de citral en el G3, se observó una menor detección en los G3 del lote 4 (NaClO) respecto a los G1.

En geles elaborados con surimis congelados durante 90 días (C90) no se evidenciaron diferencias significativas entre tipo de geles, si bien en los surimis el efecto de la congelación no fue tan evidente, en geles se observó claramente una disminución de Ani s 4 presumiblemente por efecto de la congelación de los surimis y por el tratamiento térmico utilizado durante la elaboración de los geles. La detección de Ani s 4 en los geles de G2 y G3 frente a G1 fue similar al descrito en el estudio en refrigeración (R). La mayor detección de Ani s 4 se observó en los geles elaborados con el lote 3, diferencia que en todos los casos fue significativa. Los geles del lote 1 (H₂O) presentaron la menor detección de Ani s 4, comportamiento que también se observó en los surimis correspondientes.

En el estudio efectuado en los geles elaborados con surimi congelado durante 180 días (C180) no se detectaron diferencias significativas entre tipo de geles, lotes, ni respecto al surimi del que partieron. La detección de Ani s 4 en este grupo de geles (C180) disminuyó significativamente respecto a los geles elaborados con surimi

refrigerado (R) y el efecto de la congelación del surimi fue más pronunciado que el efecto del tratamiento térmico aplicado en la elaboración de los geles.

- **Extracto crudo de *A. simplex***

En refrigeración (R), el descenso en la detección del Extracto crudo de *A. simplex* por efecto del tratamiento térmico fue más evidente en geles elaborados con surimi refrigerado (R) y se encontraron diferencias significativas en todos los geles respecto a los surimis de los que fueron elaborados. La menor detección la presentaron los geles de los lotes 1 y 4 (H₂O y NaClO) y no se encontraron diferencias significativas por el tipo de surimi con el que se elaboraron los geles (G1 y G2) ni debido a la adición de citral en los geles (G1 y G3).

En los geles elaborados con surimi conservado en congelación durante 90 días (C90), todos los geles presentaron una detección significativamente menor de Extracto crudo de *A. simplex* respecto a los surimis de los que partieron, aunque se observó un incremento significativo en la detección respecto al control elaborado con surimi refrigerado (R). Entre G1 y G2 las diferencias observadas no fueron significativas, sin embargo, la menor detección de los geles G2 respecto a los G1 se observó en los lotes 2 y 4 (BF-Na y NaClO). La inclusión de polifosfatos (STPP) en el surimi CP2 no tuvo un efecto claro en los G2 ya que en función del lote se detectó más o menos cantidad de alérgeno. La adición de citral en los geles G3, se reflejó en una menor detección de Extracto crudo de *A. simplex* en todos los lotes, aunque en el lote 2 las diferencias no fueron significativas respecto a los G1.

En los geles elaborados con surimi conservado en congelación durante 180 días (C180) no se observaron diferencias significativas entre lotes y tipo de geles. La detección Extracto crudo de *A. simplex* en los geles se mantuvo al nivel de los surimis de los que fueron elaborados, no encontrándose el efecto adicional debido a la aplicación de alta temperatura en la elaboración del gel. Al respecto, debemos considerar que en todos los lotes de surimis la detección de Extracto crudo de *A. simplex* disminuyó significativamente por efecto de la congelación prolongada. En todos los lotes y tipo de geles elaborados con surimi congelado durante 180 días

(C180), se observó que la detección de Extracto crudo de *A. simplex* fue significativamente superior a la correspondiente de los geles elaborados con surimi refrigerado (R).

Se ha demostrado ampliamente que Anis 4 es un alérgeno resistente a condiciones extremas de calor (Moneo *et al.*, 2000a; 2005; Rodríguez-Mahillo *et al.*, 2007; Vidaček *et al.*, 2009b, 2011) (Apartado 5.1) y de acuerdo a nuestros resultados se observó que el tratamiento térmico (90°C, 30 min) utilizado en la elaboración de los geles afectó más a los geles elaborados con surimi congelado 90 días (C90).

El efecto del tratamiento térmico utilizado en la elaboración geles se manifestó como una disminución en la detección de alérgenos de *Anisakis* y fue más evidente en la detección de Extracto crudo de *A. simplex*; variación que dependió del tiempo de conservación en congelación de los surimis. Resultados similares se observaron en estudios previos realizados en el Apartado 5.1.

Uno de los objetivos planteados en esta parte del estudio fue evaluar el efecto del citral (0,1%) sobre los alérgenos de *Anisakis*. Aunque en un inicio se consideró utilizarlo en la etapa de elaboración del surimi, dadas las características del proceso, se aplicó en la formulación de los geles G3 elaborados con el mismo surimi que el utilizado en los G1. En la detección de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* no se evidenciaron diferencias significativas entre los geles G1 y G3 cuando fueron elaborados con surimis refrigerados (R) o conservados en congelación durante 180 días (C180) y dependiendo del lote se observó un efecto positivo del citral en la menor detección de alérgenos, no obstante su aplicación proporcionó a los geles un olor peculiar a “cítrico” y un color amarillo característico. Una de las características que se consideran esenciales para la aceptación del surimi y geles de surimi además del olor y capacidad de formar gel, es el color. En nuestro caso, la coloración amarilla aportada por el citral a los geles G3 indica que probablemente estos geles, independientemente de su calidad tecnológica o alergénica, no tendrían aceptación comercial.

- **Inmunohistoquímica (IHC)**

El análisis por inmunohistoquímica (IHC) se realizó en algunas muestras seleccionadas con la finalidad de contrastar los resultados obtenidos por DB. En la Figura 5.53 se presenta la inmunolocalización de los surimis (CP1 y CP2) y geles (G1, G2 y G3) obtenidos en el lote 1 (H₂O), en los cuales se observa la presencia de Anis 4 confirmado los resultados obtenidos por DB.

Lote 1: H₂O

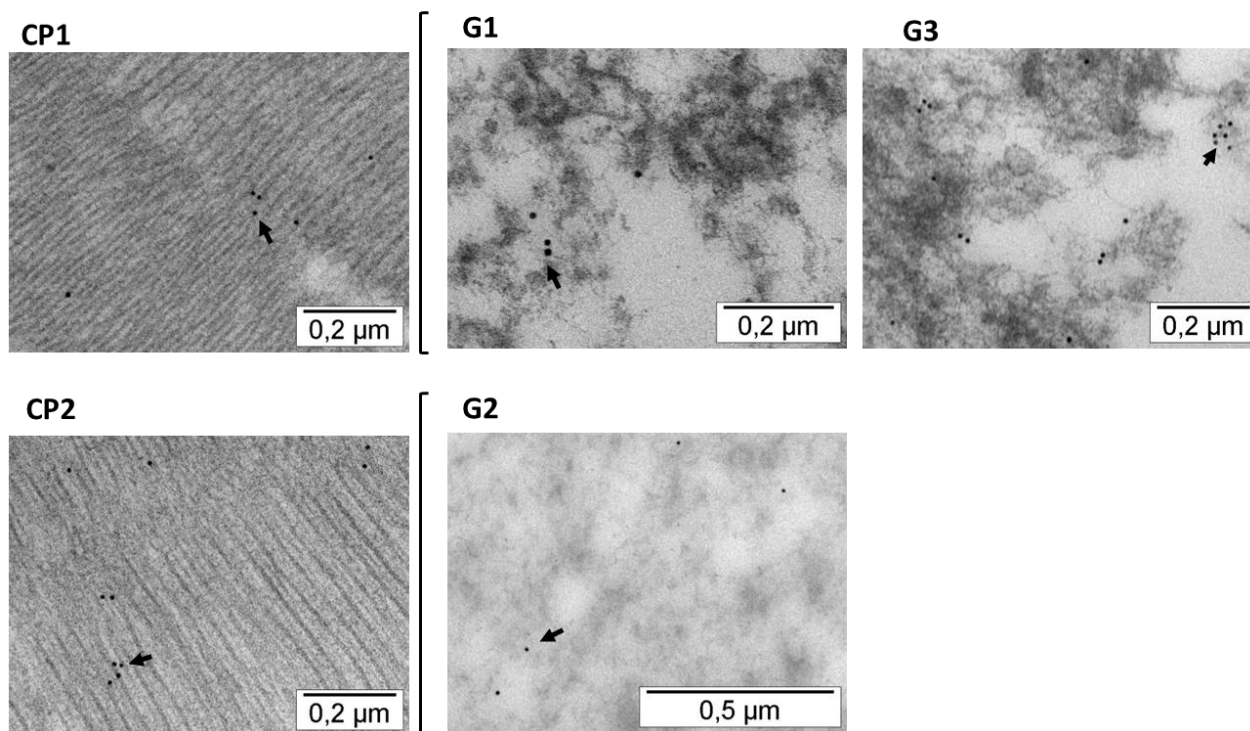


Figura 5.53 Inmunolocalización de Anis 4 en surimis (CP1y CP2) y geles (G1, G2 y G3) correspondientes al lote 1 (H₂O). **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **G1:** Gel 1 (CP1). Las partículas de 10 nm de oro conjugado con el anticuerpo secundario aparecen en la micrografía como círculos oscuros, como los indicados por flechas.

5.3.5.3.5 Efecto de la congelación en geles

Dada que la comercialización del surimi y productos derivados, es por lo general en estado congelado, en esta etapa del estudio se consideró evaluar el comportamiento de los alérgenos de *Anisakis* en geles elaborados a partir de surimi refrigerado y conservados en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta 180 días.

GELES ELABORADOS CON SURIMI REFRIGERADO ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$)

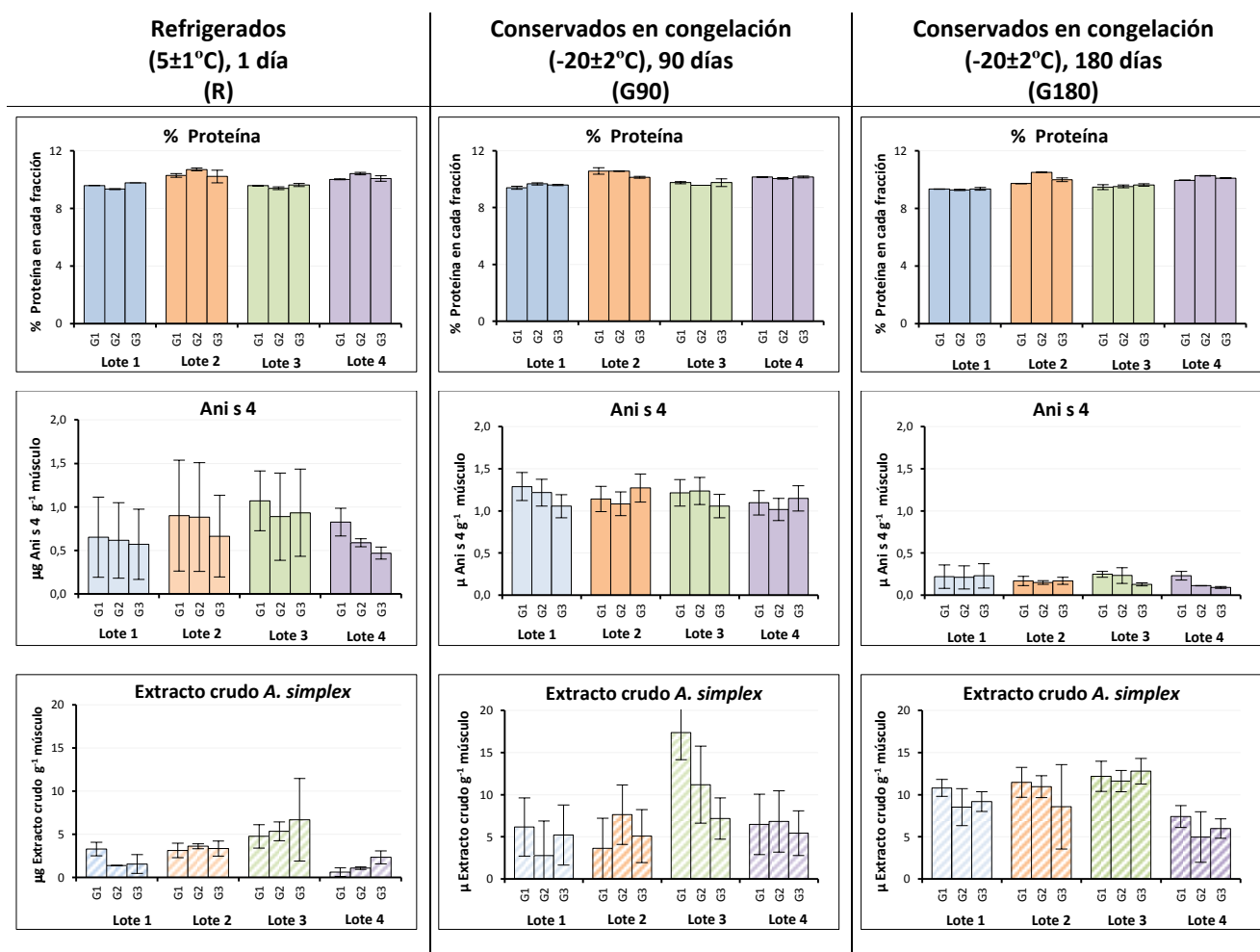


Figura 5.54 Porcentaje de proteína (%) y cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) en geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^{\circ}\text{C}$, 1 día) y surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$) durante 90 y 180 días (G90 y G180). **Lote 1:** H_2O ; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5 %; **Lote 4:** NaClO 20 ppm; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%); **G1:** Gel 1 (CP1); **G2:** Gel 2 (CP2); **G3:** Gel 3 (CP1 + Citral 0,1%).

En la Figura 5.54 se presenta el porcentaje de proteína y la cantidad de antígenos de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* detectados en geles refrigerados (R) y conservados en congelación durante 90 y 180 días (G90 y G180).

El contenido de proteína en todos los geles congelados se mantuvo constante y estuvo alrededor del 10% y coincidieron con los obtenidos antes de la congelación. Este análisis se realizó con la finalidad de verificar las posibles modificaciones del porcentaje de proteína durante la conservación de los geles en congelación debido a posibles desecaciones.

Inmunodetección de alérgenos de *Anisakis*

- Ani s 4

En los geles elaborados con surimi refrigerado y conservado en congelación durante 90 días (G90) no se encontraron diferencias significativas en la detección de Ani s 4 entre tipo de geles y lotes, aunque se observó un aumento en la detección de Ani s 4 con respecto al estudio en refrigeración (R) que fue más evidente en los geles de los lotes 1 y 4 (H₂O y NaClO). Todos los lotes de geles G90 presentaron un aumento significativo en la detección de Ani s 4 respecto a los geles elaborados con surimi congelado durante 90 días (C90).

A los 180 días de conservación de los geles en congelación (G180), los geles presentaron un descenso acusado en la alergenicidad, que se evidenció en una menor detección de Ani s 4, encontrándose diferencias significativas con respecto al tiempo de congelación pero no entre tipo de geles y lotes. No se observaron diferencias significativas entre lotes y tipo de geles entre geles elaborados con surimi congelados 180 días (C180) y geles congelados 180 días (G180).

- Extracto crudo de *A. simplex*

En refrigeración (R) no se encontraron diferencias significativas entre tipos de geles y su comportamiento se ha descrito previamente (Apartado 5.3.5.3.4).

En el estudio efectuado en geles congelados durante 90 días (G90), se observó un aumento en la detección de Extracto de *A. simplex* respecto a los geles refrigerados (R), y fue significativamente mayor en los geles de los lotes 3 y 4 (NaHCO_3 y NaClO). No se encontraron diferencias significativas entre tipo de geles debido a la acción del citral (G3) excepto en el lote 3 (NaHCO_3), que presentó una menor detección respecto al G1. Si comparamos los geles C90 y G90, evidenciamos una detección de Extracto crudo de *A. simplex* significativamente mayor en todos los lotes de los geles C90 respecto a los geles G90.

En geles congelados durante 180 días (G180), se observó un aumento en la detección de Extracto crudo de *A. simplex* en los lotes 1, 2 y 3 respecto a los geles congelados durante 90 días (G90). No se evidenciaron diferencias significativas entre tipo de geles de los diferentes lotes, aunque los geles del lote 4 (NaClO) que presentaron una menor detección. En todos los lotes de los geles G180 la detección de Extracto crudo de *A. simplex* fue significativamente mayor respecto a los geles elaborados con surimi congelado 180 días (C180).

En general, en todos los lotes de geles se evidenció un descenso significativo en la detección de Ani s 4 por efecto de la conservación en congelación prolongada, comportamiento coincidió con el observado en estudios previos (Apartado 5.3.4.2.3).

- **Inmunohistoquímica (IHC)**

En la Figura 5.55 se presentan algunos ejemplos de la inmunolocalización de Ani s 4 realizada en geles G1 de los lotes 1 y 3 (H_2O y NaHCO_3). En ambos lotes se confirma la presencia de Ani s 4 antes y después de la conservación en congelación durante 90 días.

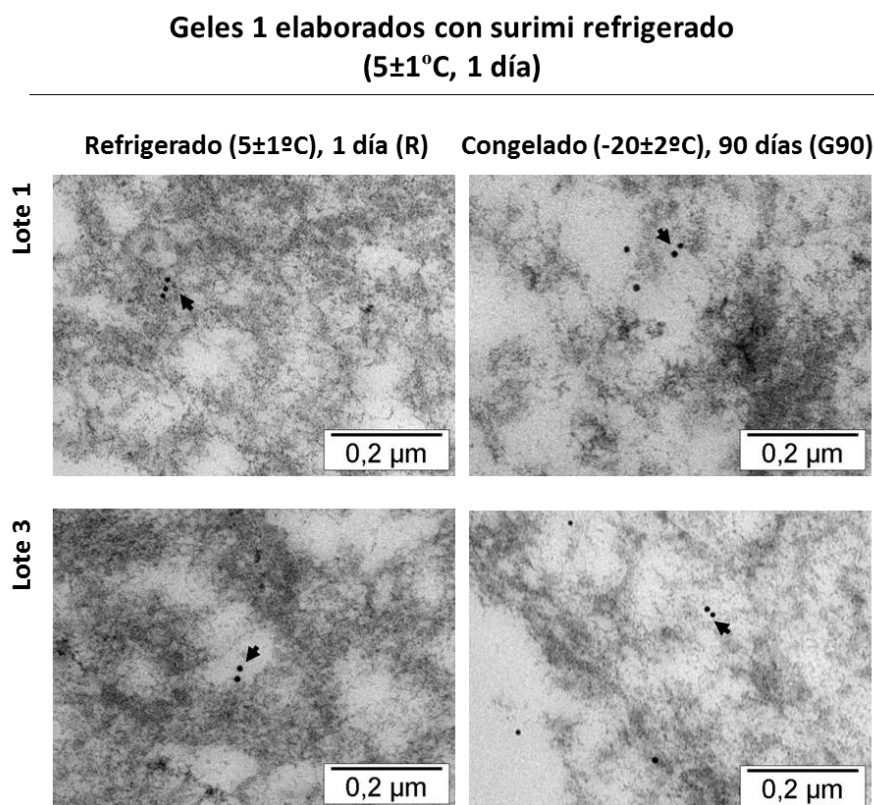


Figura 5.55 Inmunolocalización de Ani s 4 en geles 1 (G1) elaborados con surimi refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 1 día), almacenados en refrigeración y congelación ($-20\pm 1^\circ\text{C}$) durante 90 días. **Lote 1:** H_2O ; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5%; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **G1:** Gel 1 (CP1). Las partículas de 10 nm de oro conjugado con el anticuerpo secundario aparecen en la micrografía como círculos oscuros, como los indicados por flechas.

En función a los resultados obtenidos en las técnicas de inmunodetección, se logró confirmar la sensibilidad de Ani s 4 a congelación prolongada, que es más temprana cuando se elaboran los geles con surimi congelado que cuando los geles se conservan en congelación durante el mismo periodo. Durante la conservación en congelación del surimi las proteínas del músculo forman agregados, aunque se ha establecido que estos agregados no disminuyen su solubilidad durante la técnica de extracción para ID (Apartado 5.3.4.3.2, Figura 5.42), de forma similar las proteínas alergénicas en especial las de bajo peso molecular como Ani s 4, podrían interaccionar con proteínas del músculo durante el proceso de elaboración de los geles, lo que significaría que pierdan su capacidad alergénica o en su defecto que no pudieran detectadas por DB.

Apariencia de geles congelados

En la Figura 5.56 se presentan algunos ejemplos de micrografías de geles G1 obtenidos de surimi refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$) y congelados ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 90 días.

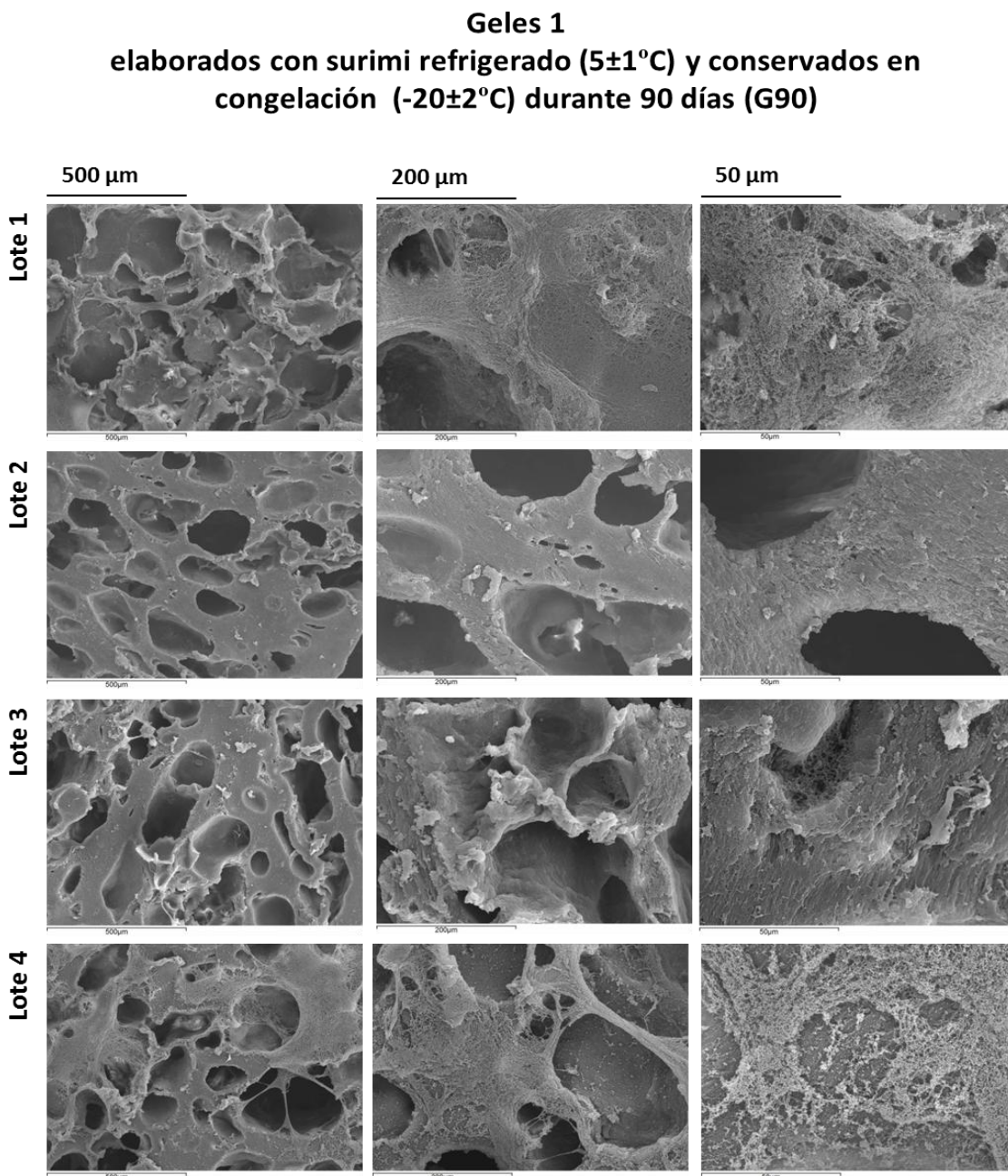


Figura 5.56 Microscopia electrónica de barrido (SEM) de geles 1 (G1) elaborados a partir de surimi refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$) y conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 90 días (G90). **Lote 1:** H_2O ; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5 %; **Lote 4:** NaClO 20 ppm; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **G1:** Gel 1 (CP1).

El estudio por SEM en geles congelados se realizó con la finalidad de verificar las posibles modificaciones en las estructuras de los geles durante la conservación en congelación. Aunque no se observaron grandes diferencias estructurales, las redes formadas en los geles G1 del lote 2 (BF-Na) y lote 3 (NaHCO₃) presentaron estructuras un poco más compactas, similares a las observadas en los geles elaborados con surimi congelado durante 90 días (Apartado 5.3.4). La presencia de burbujas en los geles se debe a las condiciones de elaboración en las que no se utilizó vacío durante su fabricación.

Los resultados obtenidos en esta parte del estudio nos sugieren que la conservación en congelación del surimi y geles disminuye la detección de Anisakis 4, aunque este comportamiento es más evidente al elaborar geles con surimi conservado en congelación.

El tratamiento térmico utilizado en la elaboración de geles disminuyó la detección de Anisakis 4 y Extracto crudo de *A. simplex*, comportamiento que también se observó en los estudios en el Apartado 5.1. En geles elaborados con surimi refrigerado (R) el efecto del calor fue más acusado en Extracto crudo de *A. simplex*, mientras que para Anisakis 4 se evidenció en geles elaborados con surimi conservado en congelación (C90).

Dependiendo del lote, el uso del citral en la formulación de los geles G3 produjo una menor detección de alérgenos de *Anisakis*, sin embargo, su aplicación proporcionó a los geles ciertas características sensoriales que independientemente de su calidad tecnológica o alergénica, evitarían su aceptación comercial.

En la Figura 5.57 se presenta el porcentaje de proteína y la cantidad de Anisakis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* durante todas las etapas del proceso de elaboración de surimi geles y estudios realizados en el tiempo.

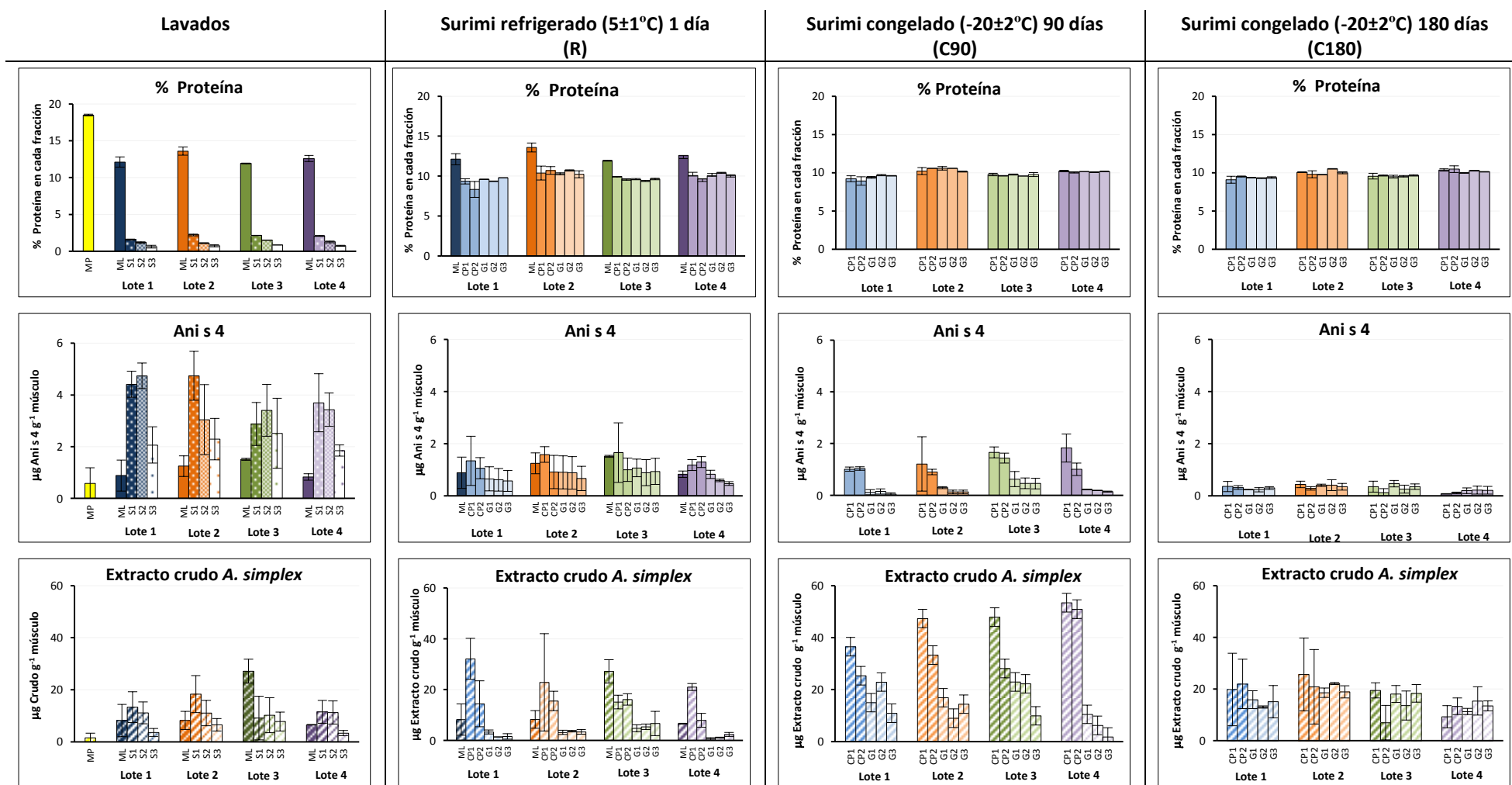


Figura 5.57 Porcentaje de proteína (%) y cantidad de Anis 4 y Extracto crudo de *A. simplex* ($\mu\text{g g}^{-1}$) de músculos lavados, surimis y geles. **Lote 1:** H_2O ; **Lote 2:** BF-Na pH 7,5; **Lote 3:** NaHCO_3 0,5 %; **Lote 4:** NaClO 20 ppm; **ML:** Músculo lavado; **S1:** Solución del 1º lavado; **S2:** Solución del 2º lavado; **S3:** Solución del 3º lavado; **CP1:** Surimi 1 (SA 4% + SO 4%); **CP2:** Surimi 2 (SA 4% + SO 4% + STPP 0,2%); **G1:** Gel 1 (CP1); **G2:** Gel 2 (CP2); **G3:** Gel 3 (CP1 + Citral 0,1%); **Tiempo de conservación del surimi:** **R**-Refrigeración; **C90**-Congelación 90 días; **C180**-Congelación 180 días.

Al realizar un análisis global del proceso, observamos que en la etapa de lavados se logró solubilizar y eliminar las proteínas alergénicas en las soluciones de lavados lo que implicó una menor detección Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* en el músculo lavado que posteriormente fue utilizado como materia prima para la obtención de surimi y geles de surimi.

En la etapa de obtención de surimi, dependiendo del lote y tiempo de conservación del surimi, el uso de diferentes combinaciones de crioprotectores no implicó una menor detección de Ani s 4 y Extracto crudo de *A. simplex* respecto al músculo lavado del que partieron, ni diferencias significativas entre tipos de surimis.

En todos los lotes la conservación en congelación del surimi en las condiciones estudiadas implicó una disminución de Ani s 4 aunque no necesariamente una menor detección de Extracto crudo de *A. simplex*.

El tratamiento térmico utilizado en la elaboración de geles con surimis congelados se manifestó en una disminución en la detección de Ani s 4 en los geles, la variación dependió del tiempo de conservación de los surimis.

Actualmente no se han encontrado trabajos publicados sobre el comportamiento de los alérgenos de *Anisakis* en surimi o productos derivados, sin embargo estudios realizados en músculo de merluza infestada han demostrado la presencia de Ani s 4 durante la conservación en congelación ($-20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 11 meses). Los resultados obtenidos en esta parte del estudio sugieren que la conservación en congelación produce una disminución de Ani s 4 más no su total eliminación del producto final, por lo que dependiendo del tratamiento aplicado, los productos derivados del surimi podrían suponer un riesgo para la salud para aquellos pacientes previamente sensibilizados a alérgenos de *A. simplex*.

6 CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

- Las técnicas de extracción y detección de alérgenos de *Anisakis* en las condiciones estándar empleadas son adecuadas para identificar alérgenos en músculo de pescado en todas las condiciones ensayadas.
- La conservación en congelación en condiciones comerciales en periodos superiores a un año no afectó la tasa de detección de *Anisakis*.
- El tratamiento térmico de esterilización de pescado infestado produjo un descenso en los antígenos de *Anisakis*, incluso en los alérgenos termo-resistentes, aunque en todos los casos se ha detectado antigenicidad residual.
- La operación de tamizado durante el proceso de elaboración de surimi ocasionó una mayor retención de larvas en el tamiz, que estuvo inversamente relacionada con el diámetro de los orificios. Esto implicó que pasen al músculo tamizado menor cantidad de larvas, aunque se produjo una mayor rotura al disminuir el diámetro de los orificios.
- En la etapa de lavado en el proceso de elaboración de surimi, un alto porcentaje de alérgenos de *A. simplex* pasó del músculo infestado a las soluciones de lavado, lo que significó que en el músculo lavado que se emplea para la elaboración del surimi y geles, descendiese la tasa de alérgenos. El porcentaje dependió del número y de las condiciones de lavado utilizadas.
- No se ha observado un efecto claro en la detección de alérgenos de *Anisakis* de las distintas soluciones de lavado, ni de los crioprotectores añadidos al surimi.
- La conservación en congelación del surimi produjo un descenso en la detección de *Anisakis*, más acusado al prolongarse el tiempo de conservación. Este efecto no se observó en el Extracto crudo de *A. simplex*.

- El tratamiento térmico estándar utilizado en la elaboración de geles tipo *kamaboko* produjo un descenso en la detección de *Anisakis*, que se manifestó de forma más evidente al prolongarse el periodo de conservación en congelación. Este descenso se observó antes cuando los geles se elaboraron a partir de surimi conservado en congelación que cuando los geles se conservaron congelados en las mismas condiciones de tiempo y temperatura.
- La adición de citral impartió a los geles unas características sensoriales no deseadas, por lo que no se considera que puedan tener actualmente aceptación comercial.
- La disminución de alergenidad en el músculo infestado al aplicar las tecnologías de tratamiento térmico de esterilización y de elaboración de surimi y geles, abre una posibilidad de utilización de músculo infestado tanto al producirse la muerte de las larvas en las fases de producción y conservación, como por la disminución de la tasa de alergenidad en los productos enlatados así como en el surimi y en los geles finales. Sin embargo, en todos los casos se ha detectado una alergenidad residual, por lo que estos productos podrían suponer un riesgo para la salud en consumidores que han sido previamente sensibilizados a alérgenos de *A. simplex*.

7 BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFIA

AAITO-IFIACI *Anisakis* Consortium. 2011. *Anisakis* hypersensitivity in Italy: prevalence and clinical features: a multicenter study. *Allergy* 66: 1563-1569

Aalberse, R. 2000. Structural biology of allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.* 106: 228-38.

Abattouy, N. 2012. Prevalencia y factores de riesgo de la anisakiosis en el norte de Marruecos. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Abattouy, N.; Valero, A.; Benajiba, M.; Lozano, J. and Martín-Sánchez J. 2011. *Anisakis simplex* s.l. parasitization in mackerel (*Scomber japonicus*) caught in the North of Morocco-Prevalence and analysis of risk factors. *Int. J. Food Microbiol.* 150: 136-139.

Abaunza, P.; Villamor, B. and J. R. Pérez. 1995. Infestation by larvae of *Anisakis simplex* (Nematoda: Ascaridata) in horse mackerel, *Trachurus trachurus*, and Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*, in ICES Divisions VIIIb, VIIIc and IXa (N-NW of Spain). *Scientia Marina*, 59(3-4): 223-233.

Abollo, E.; Gestal, C. and Pascual, S. 2001. Anisakid infection in the European shag *Phalacrocorax aristotelis aristotelis*. *J. Helminthol.*, 75:209-214.

Abollo, E.; Paggi, L.; Pascual, S. and D'Amelio, S. 2003. Occurrence of recombinant genotypes of *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in an area of sympatry. *Infect. Genet. Evol.*, 3:175-181.

Adams, A. and Devlieger, D. 2000. Parásitos del mar: la prevención, la inspección y el HACCP. En: *Manual de enfermedades transmitidas por alimentos*. Hui, Y.; Sattar, S.; Murrell, K.; Nip, W. and Stanfield M. Eds., p 407-423.

AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. 2007. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre medidas para reducir el riesgo asociado a la presencia de *Anisakis*. Revista del Comité Científico N° 6.

AESAN, Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. 2011. La alergia por *Anisakis* y medidas de prevención. Opinión del Comité Científico de la AESA sobre una cuestión presentada por la Presidencia, en relación con los factores favorecedores de la aparición de alergia a *Anisakis*, así como de las medidas de prevención aplicables.

Alvarez, C. 1993. Influencia de factores físico-químicos en la formación de geles elaborados con surimi de sardina (*Sardina pilchardus*). Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. pp 242.

Alvarez, C.; Couso, I. and Tejada, M. 1995. Sardine surimi gels as affected by salt concentration, blending, heat treatment and moisture. J. Food Sci., 60(3): 622-626.

Alvarez, C.; Huidobro, A.; Tejada, M.; Vázquez, I.; De Miguel, E. and Gómez de Segura, I. A. 1999. Consequences of frozen storage for nutritional value of hake. Food Sci. Tech. Int., 5 (6): 493-499.

Alvarez, C.; Montero, P.; Tejada, M. and Borderías, J. 1990. Modification of gel strength during storage of gels made from Alaska Pollack surimi. En: *Chilling and freezing of new fish products*. Aberdeen (Reino Unido), 18-20 de Septiembre. Editado por el Instituto Internacional del Frío, París (Francia), p 77-83.

Anadón, A. M.; Romarís, F.; Escalante, M.; Rodríguez, E.; Gárate, T.; Cuéllar, C. and Ubeira, F. 2009. The *Anisakis simplex* Ani s7 major allergen as an indicator of true *Anisakis* infections. Clin. Exp. Immunol., 156: 471-478.

Anderson, R. 1992. Nematode parasites of vertebrates: Their development and transmission. CAB International, Wallingford, UK.

Angot, V. 1993. Infestation de 7 poissons de consommation courante par des larves de nématodes Anisakidés; efficacité des méthodes de filetage. Conséquences sanitaires et prophylactiques. Rouen, Faculté de médecine et de pharmacie.

Añíbarro, B.; Seoane, F. and Múgica, M. 2007. Involvement of hidden allergens in food allergic reactions. J Investig. Allergol. Clin. Immunol., 17(3):168-72.

AOAC. 1995. Parasites in Fish Muscle: Candling Procedure. Sec. 35.1.38, Method 985.12. In *Official Methods of AOAC International*, 16th Ed., P.A. Cunniff (Ed.), p. 22-23. AOAC International, Gaithersburg, MD.

AOAC. 2005. *Official Methods of Analysis*, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.

Arakawa, T and Timasheff, S. 1982. Stabilization of protein structure by sugars. Biochemistry, 21(25): 6536-6544.

Arizono, N.; Yamada, M.; Tegoshi, T. and Yoshikawa, M. 2012. *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii*: Biological characteristics and pathogenetic potential in human anisakiasis. Foodborne Pathog. Dis., 9: 1-5.

Arlian, L. G.; Morgan, M.; Quirce, S.; Marañón, F. and Fernández-Caldas, E. 2003. Characterization of allergens of *Anisakis simplex*. Allergy, 58: 1299-1303.

Armentia, A.; Martín-Gil, F.; Pascual, C.; Martín-Esteban, M.; Callejo, A. and Martínez, C. 2006. *Anisakis* allergy after eating chicken meat. J. Investig. Allergol. Clin Immunol., 16(4): 258-263.

Arrieta, I.; del Barrio, M.; Vidarte, L.; del Pozo, V.; Pastor, C.; Gonzalez-Cabrero, J.; Cardaba, B.; Rojo, M.; Minguez, A.; Cortegano, I.; Gallardo, S.; Aceituno, E.; Palomino, P.; Vivanco, F. and Lahoz, C. 2000. Molecular cloning and characterization of an IgE-reactive protein from *Anisakis simplex*: Anis s 1. Mol Biochem Parasitol., 107: 263-68.

Aspholm, P. 1995. *Anisakis simplex* Rudolphi, 1809, infection in fillets of Barents Sea cod *Gadus morhua* L. Fish. Res., 23: 375-379.

Asturias, J.; Eraso, E. and Martínez, A. 2000a. Cloning and high level expression in *Escherichia coli* of an *Anisakis simplex* tropomyosin isoform. Mol Biochem Parasitol., 108: 263-7.

Asturias, J.; Eraso, E.; Moneo, I. and Martínez, A. 2000b. Is tropomyosin an allergen in *Anisakis*?. Allergy, 55: 898-9.

Astwood, J.; Leach, J. and Fuchs, R. 1996. Stability of food allergens to digestion in vitro. Nat. Biotechnol., 14: 1269-1273.

Audicana, L.; Audicana, M.; Fernández de Corres, L. and Kennedy, M. 1997. Cooking and freezing may not protect against allergic reactions to ingested *Anisakis simplex* antigens in human. Vet. Rec., 140: 235.

Audicana, M. and Kennedy, M. 2008. *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. Clin. Microbiol. Rev., 21(2): 360-379.

Audicana, M.; Ansotegui, I.; Fernández de Corres, L. and Kennedy, M. 2002. *Anisakis simplex*: dangerous-dead and alive?. Trends Parasitol., 18: 20-25.

Audicana, M.; Fernandez de Corres, L.; Muñoz, D.; Fernandez, E.; Navarro, J. and Del Pozo, M. 1995. Recurrent anaphylaxis caused by *Anisakis simplex* parasitizing fish. J. Allergy Clin Immunol., 96: 558-560.

- Baeza, M. L.; Zubeldia, J. and Rubio, M. 2001. *Anisakis simplex* allergy. ACI International, 13: 242-249.
- Bereciartua, J. 2005. Procedimiento para eliminar parásitos del pescado. Patente N° ES 2 213 486 B1. Oficina Española de Patentes y Marcas.
- Berland, B. 1961. Nematodes from some Norwegian marine fishes. Sarsia, 2: 1-50.
- Besler, M. 2001. Determination of allergens in foods. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 20: 662-672.
- Bier, J. 1976. Experimental anisakiasis: cultivation and temperature tolerance determinations. J. Milk Food Technol., 39: 132-137.
- Björkstén, B.; Crevel, R.; Hischenhuber, C. Løvik, M.; Samuels F.; Strobel, S.; Taylor, S.; Wal, J. and Ward, R. 2008. Criteria for identifying allergenic foods of public health importance. Regul. Toxicol. Pharm., 51: 42-52.
- Blanco, M.; Sotelo, C.; Chapela, M. and Pérez-Martín, R. 2006. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. Trends Food Sci. Technol., 18(1): 29-36.
- Borderías, J. y Tejada, M. 1987. El “surimi”. Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment., 27(1): 1-14.
- Brasó, J. y Jorro, G. 2003. Manual de Alergia Clínica. Ed. Masson, S.A. Barcelona.
- Brutti, A; Rovere, P.; Cavallero, S.; D’Amelio, S.; Danesi, P. and Arcangeli, G. 2010. Inactivation of *Anisakis simplex* larvae in raw fish using high hydrostatic pressure treatments. Food Control, 21: 331-333.

Bublitz, C. and Choudhury, G. 1992. Effect of light intensity and color on worker productivity and parasite detection efficiency during handling of cod fillets. *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, 1: 75-89.

Caballero, M. and Moneo, I. 2004. Several allergens from *Anisakis simplex* are highly resistant to heat and pepsin treatments. *Parasitol. Res.*, 93: 248-251.

Caballero, M.; Moneo, I.; Gómez-Aguado, F.; Corcuera, M.; Casado I. and Rodríguez-Pérez, R. 2008. Isolation of Ani s 5, an excretory-secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of *Anisakis* larvae sensitization. *Parasitol. Res.*, 103(5): 1231-1233.

Caballero, M.; Umpierrez, A.; Moneo, I. and Rodríguez-Pérez, R. 2011. Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: Cloning and heterologous expression. *Parasitol. Int.*, 60: 209-212.

CAC/RCP 10-1976. Código Internacional Recomendado de Prácticas para el Pescado en Conserva. *Codex Alimentarius*.

CAC/RCP 23-1979, Rev. 1993. Código de prácticas de higiene para alimentos poco ácidos y alimentos poco ácidos acidificados envasados. *Codex Alimentarius*.

CAC/RCP 52-2003, Rev. 2011. Código de prácticas para el pescado y los productos pesqueros. *Codex Alimentarius*.

Careche, M. and Tejada, M. 1990. The effect of neutral and oxidized lipids on functionality in hake (*Merluccius merluccius* L), a dimethylamine and formaldehyde-forming species during frozen storage. *Food Chem.*, 36: 113-128.

Careche, M.; Del Mazo, M.; Torrejón, P.; Tejada, M. 1998. Importance of frozen storage temperature in the type of aggregation of myofibrillar proteins in cod (*Gadus morhua*) fillets. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1539-1546.

Carvajal, P.; Lanier, T. and Mac Donald, G. 2005. Stabilization of proteins in surimi. En: *Surimi and surimi seafood*. Park, J. Ed. 2nd edition, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, Florida, p 163-225.

Ceballos-Mendiola, G.; Valero, A.; Polo-Vico, R.; Tejada, M.; Abattouy, N.; Karl, H.; De las Heras, C. and Martín-Sánchez, J. 2010. Genetic variability of *Anisakis simplex* s.s. parasitizing European hake (*Merluccius merluccius*) in the Little Sole Bank area in the Northeast Atlantic. *Parasitol. Res.*, 107(6): 1399-1404

Céspedes, R.; Iannaccone, J. y Salas, A. 2011. Helmintos parásitos de *Dosidicus gigas* “Pota” eviscerada en Arequipa, Perú. *Ecol. Apl.*, 10(1): 1-11.

Cheng, T. 1982. *Anisakis*. Handbook series in zoonoses: parasitic zoonoses. CRC Press. Florida. 2: 37-52.

Choudhury, G.; Jenks, W.; Wikswo, J. and Bublitz, C. 2002. Effects of parasite attributes and injected current parameters on electromagnetic detection of parasites in fish muscle. *J. Food Sci.*, 67(9): 3381-3387.

Clarkson, A.; Lefevre P. and Tichener-Hooker, N. 1993. A study of process interactions between cell disruption and debris clarification stages in the recovery of intracellular products. *Biotechnol. Prog.*, 9: 462-467.

CODEX, 2004. Standard for salted atlantic herring and salted sprat. CODEX STAN 244-2004.

Cooper, G. 1996. The cell. A molecular approach. Oxford University press. ASM press. Washington, USA. p 28.

Costa, G.; Pontes, T.; Mattiucci, S. and D'Amelio, S. 2003. The occurrence and infection dynamics of *Anisakis* larvae in the black-scabbard fish, *Aphanopus carbo*, chub mackerel, *Scomber japonicus*, and oceanic horse mackerel, *Trachurus picturatus* from Madeira, Portugal. *J. Helminthol.*, 77: 163-166.

Cuellar, M.; Fontanillas, J. y Pérez-Fuentes, J. 1991. Biología y epidemiología de las anisakidosis larvaria. *Enfermedad del arenque. Ciencias Veterinarias*, 4: 57-61.

D'Amelio, S.; Mathiopoulos, K.D.; Santos, C.P.; Pugachev, O.N.; Webb, S.C.; Picanço, M. and Paggi, L. 2000. Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction based restriction fragment length polymorphism. *Int. J. Parasitol.*, 30: 223-226.

Darnell, J.; Lodish, H y Baltimore, D. 1993. *Biología celular y molecular*. Ediciones Omega, S.A. p 156-160.

Daschner, A.; Vega de la Osada, F. and Pascual, C. 2005. Allergy and parasites reevaluated: wide-scale induction of chronic urticaria by the ubiquitous fishnematode *Anisakis simplex* in an endemic region. *Allergol. Immunopathol.*, 33(1): 31-37.

Dávila, C.; Malagón, D.; Valero, A.; Benítez, R. and Adroher, F. 2006. *Anisakis simplex*: CO(2)-fixing enzymes and development throughout the in vitro cultivation from third larval stage to adult. *Exp. Parasitol.*, 114(1): 10-15.

De Harven, E.; Leung, R. and Christensen, H. 1984. A novel approach for scanning electron microscopy of colloidal gold labelled cell surfaces. *J. Cell Biol.*, 99: 53-57.

De Ley, P. and Blaxter, M. L. 2004. A new system for Nematoda: combining morphological characters with molecular trees, and translating clades into ranks and taxa. En: *Nematology monographs and perspectives*, Cook, R. and Hunt, D. Eds., Brill Publishing, Leiden-Boston, p 633-653.

Deardorff; T. and Kent, M. 1989. Prevalence of larval *Anisakis simplex* in pen-reared and wild-caught salmon (Salmonidae) from Puget Sound, Washington. J. Wildl. Dis. 25: 416-419.

Del Mazo, M.; Torrejón, P.; Careche, M. and Tejada. M. 1999. Characteristics of the salt-soluble fraction of hake (*Merluccius merluccius*) fillets stored at -20 and -30°C. J. Agric. Food Chem., 47(4): 1372-1377.

Del Pozo, M.; Moneo, I.; Fernández de Corres, L.; Audicana. M.; Muñoz, D.; Fernández, E.; Navarro, J. and García, M. 1996. Laboratory determinations in *Anisakis simplex* allergy. J. Allergy Clin. Immunol., 97: 977-984.

Directiva 91/493/CEE del Consejo de 22 de Julio de 1991 por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y a la puesta en el mercado de los productos pesqueros. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, DOCE L268/15 del 24.09.91. Disponible en:

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1991:268:0015:0034:ES:PDF>

Decisión 93/140/CEE de la Comisión de 19 de Enero de 1993, por la que se establecen las modalidades de control visual para detectar parásitos en los productos de la pesca. Diario Oficial de las Comunidades Europeas, DOCE L056 de 09.03.93. Disponible en:

<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31993D0140:ES:HTML>

Dong, F.; Cook, A. and Herwig. R. 2003. High hydrostatic pressure treatment of finfish to inactivate *Anisakis simplex*. J. Food Protect., 66: 1924- 1926.

Duerr, J. 2006. Immunohistochemistry. *WormBook*, Ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook. Disponible en: <http://www.wormbook.org>

EFSA. 2010. Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). EFSA Journal, 8(4): 1543.

FAO/IAEA. 1992. Final FAO/IAEA research co-ordination meeting on the use of irradiation to control infectivity of food-borne parasites. Food Irrad. Newsl., 16: 5-14.

Farjallah, S.; Busi, M.; Mahjoub, M.; Slimane, B.; Paggi, L.; Said, K. and D'Amelio, S. 2008. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes off the Moroccan and Mauritanian coasts. Parasitol. Inter. 57: 430-436.

FDA U.S. 2011 Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. Fourth Edition. April 2011, Department of Health and Human Services. Public Health Service. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Food Safety. Chapter 5 Parasites p 91-98.

FDA/CFSAN, 2001. Processing parameters needed to control pathogens in cold smoked fish. Chapter V. Potential hazards in cold-smoked fish: Parasites. U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. Rockville, MD.

Fennema, O. 1985. Introducción a la Ciencia de los Alimentos. Editorial Reverté. Zaragoza, España.

Footitt, R. y Lewis, A. 1999. Enlatado de pescado y carne. John West Foods Ltd., Liverpool. 352 pp.

Fredericksen, D. and Specian, R. 1981. The value of cuticular fine structure in identification of juvenile anisakine nematodes. J. Parasitol., 67: 647-655.

Fujinaga, M.; Chernaia, M.; Tarasova, N.; Mosimann, S. and James, M. 1995. Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. Protein Sci., 4(5): 960-972.

Fukuda, T.; Aji, T. and Tonga, Y. 1988. Surface ultrastructure of larval Anisakidae (Nematoda: Ascaridoidea) and its identification by mensuration. *Acta. Med. Okayama*, 42: 105-116.

Fukuda, Y.; Yamaguchi, T.; Sakukida, Y. and Kawamura, K. 1981. Effect of pH on the freezing denaturation of mackerel myofibrillar proteins. Meeting of All-Japan Fishery Research Stations on Marine Products (Fisherys Agency). pp 81-84.

García, M.; Moneo, I.; Audicana, M.; Del Pozo, M; Muñoz, D.; Fernández, E.; Diez, J.; Etxenaguia, M.; Ansotegui, I. and Fernández de Corres, L. 1997. The use of IgE immunoblotting as a diagnostic tool in *Anisakis simplex* allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 99: 497-501.

González, S.; González, R.; Arias, L.; Gil, A.; Vicente, J. and Corral, E. 2005. Anisakiasis gastrointestinal manifestations: description of 42 cases. *Rev. Clin. Esp.*, 205: 311-315.

González-Muñoz, M.; Luque, R.; Nauwelaers, F. and Moneo, I. 2005. Detection of *Anisakis simplex*-induced basophil activation by flow cytometry. *Cytometry B. Clin. Cytom.*, 68: 31-36.

González-Muñoz, M.; Rodríguez-Mahillo, A. and Moneo I. 2009. Different Th1/Th2 responses to *Anisakis simplex* are related to distinct clinical manifestations in sensitized patients. *Parasite Immunol.*, 31: 1-7.

Goto, C.; Kasuka, S.; Koga, K.; Ohtomo, H.; and Kagei, N. 1990. Lethal efficacy of extract from *Zingiber officinale* (traditional Chinese medicine) or [6]-shogaol and [6]-gingerol in *Anisakis* larvae in vitro. *Parasitol Res.*, 76(8): 653-6.

Haard, N. 1990. Biochemical reactions in fish muscle during frozen storage. En: *Sea food science and technology*. Bligh, G. Ed., Fishing News Books, London, UK, p 176-209.

Hamann, D.; Amato, P.; Wu, M. and Foegeding, E. 1990. Inhibition of modori in surimi by plasma hydrolysate and egg white. *J. Food Sci.*, 55: 665-669.

Hames, B. 1985. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. En: *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*. Hames, B. and Rickwood, D. Eds., IRL Press, Oxford, p 1-91.

Hamm, R. 1986. Functional properties of the miofibrillar system and their measurements. En: *Muscle as food*. Bechtel, P. Ed., Orlando, FL, Academic Press, p 135-199.

Heia, H.; Sivertsen, A.; Stormo, S.; Elvevoll, E.; Wold, J. and Nilsen H. 2007. Detection of nematodes in cod (*Gadus morhua*) fillets by imaging spectroscopy. *J. Food Sci.*, 72(1): E11-E15.

Heiss, R. 1978. Principio de envasado de los alimentos. Editorial Acribia. Zaragoza, España.

Herrera, J. and Mackie, I. 2004 Cryoprotection of frozen-stored actomyosin of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by some sugars and polyols. *Food Chem.*, 84(1): 91-97.

Herrera, C.; Velásquez, L.; Mancini, M. y Alvarez, S. 2001. Digestión proteica con microondas y su aplicación en preparación de muestras para análisis de harina de pescado. *Bol. Soc. Chil. Quím.*, 46(4): 487-494.

Herson, A.; Hulland, E. y Sáenz, B. 1985. Conservas Alimenticias: Procesado Térmico y Microbiología. Editorial Acribia. Zaragoza-España.

Hierro, I.; Valero, A.; Pérez, P.; González, M.; Cabo, M. M.; Montilla, M. P. and Navarro, M. C. 2004. Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. *Phytomedicine*, 11: 77-82.

Hierro, I.; Valero, A. and Navarro, M. 2006. In vivo larvicidal activity of monoterpenic derivatives from aromatic plants against L3 larvae of *Anisakis simplex s.l.* Phytomedicine, 13: 527-531.

Hodges, G.; Smolira, M. and Livingston, D. 1984. Scanning Electron Microscope Immunocytochemistry in Practice. Immunolabelling for Electron Microscopy, Eds. Polak J. Varndell I, Elsevier Science Publishers BV, Amsterdam, 189-233.

Højgaard, D. 1998. Impact of temperature, salinity and light on hatching of eggs of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae), isolated by a new method, and some remarks on survival of larvae. Sarsia, 83: 21-28.

Huang, W. 1990. Méthodes de recherche des larves d'anisakidés dans les poissons marins. Possibilités d'application à l'inspection des poissons commercialisés en région parisienne. Réc. Méd. Vet., 166: 895-900.

Huidobro, A. y Tejada, M. 1993. Revisión: Propiedades de hidratación del músculo de pescado. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment., 33(4): 365-381.

Huidobro, A.; Alvarez, C. and Tejada, M. 1998. Hake muscle altered by frozen storage as affected by added ingredients. J. Food Sci., 63(4): 638-643.

Hultin, H. and Kelleher, S. 1999. Process for isolating a protein composition from a muscle source and protein composition, US Patent N° 6,005,073.

Hultin, H. and Kelleher, S. 2000. A process for isolating edible protein from animal muscle by solubilizing the protein in an alkaline aqueous solution is disclosed, US Patent N° 6,136,959.

Hultin, H.; Kristinsson, H.; Lanier, T. and Park, J. 2005. Process for recovery of functional proteins by pH shifts. En: *Surimi and surimi seafood*. Park, J. Ed. 2nd edition, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, Florida, p 107-139.

Huss, H. 1993. Assurance of seafood quality. FAO Fisheries Technical Paper N° 334. Rome, FAO.

Huss, H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. FAO Fisheries Technical Paper N° 348. Rome, FAO.

Huss, H.; Ababouch, L. y Gram, L. 2003. Assessment and management of seafood safety and quality. FAO Fisheries Technical Paper N° 444. Rome, FAO.

Iglesias, R.; Leiro, J.; Ubeira, F.; Santamarina, M. and Sanmartin, M. 1993. *Anisakis simplex*: antigen recognition and antibody production in experimentally infected mice. Parasite Immunol., 15: 243-250.

Iglesias, R.; Leiro, J.; Ubeira, F.; Santamarina, M. and Sanmartin, M. 1995. *Anisakis simplex*: stage-specific antigens recognized by mice. J. Helminthol., 69: 319-324.

Ikeda, K.; Kumashiro, R. and Kifune, T. 1989. Nine cases of acute gastric anisakiasis. Gastrointest. Endosc., 35: 304-308.

Incorvaia, I. and Hernández D. 2006. Nematodes parásitos como indicadores biológicos de *Macruronus magellanicus* (Parasites nematodes as biological tags of *Macruronus magellanicus*). INIDEP Informe Técnico 61 Diciembre 2006. Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, Argentina, pp 36.

IUIS International Union of Immunological Societies, Allergen Nomenclature Sub-Committee. Allergen Nomenclature. Disponible en:
<http://www.allergen.org/index.php>

- Ironside, J. and Love, R. M. 1958. Studies on protein denaturation in frozen fish. Biological factors influencing the amounts of soluble and insoluble protein present in the muscle of North Sea cod. J. Sci. Agric., 9: 597-617.
- Ishikura, H.; Kikuchi, K.; Nagasawa, K.; Ooiwa, T.; Takamiya, H.; Sato, N. and Sugane, K. 1993. Anisakidae and Anisakidosis. Prog. Clin. Parasitol., 3: 43-101.
- Itoh, T.; Yoshinaka, R. and Ikeda, S. 1979. Effects of cysteine and cystine on the gel formation of fish meat by heating. Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish., 45: 341-345.
- Jemmi, T.; Schmitt, M. and Rippen, T. 2000. Safe handling of seafood. En: *Safe handling of foods*. Farber, J. and Todd, E. Eds., Marcel Dekker Inc., New York, p 105-165.
- Jones, R. and Landon, J. 2002. Enhanced pepsin digestion; a novel process for purifying antibody F(ab')₂ fragments in high yield from serum. J. Immunol. Methods, 263: 57-74.
- Karl, H. 2008. Nematode larvae in fish on the German market-20 years of consumer related research. Arch. Lebensmittelhyg, 59: 107-116.
- Karl, H. and Leinemann, M. 1993. A fast and quantitative detection method for nematodes in fish fillets and fishery products. Arch. Lebensmittelhyg, 44: 105-128.
- Karl, H.; Baumann, F.; Kuhn, T. and Klimpel, S. 2011. *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. Dis. Aquat. Org., 94: 201-209.
- Karl, H.; Bekaert, K.; Bergé, J.; Cadun, A.; Duflos, G.; Tejada, M.; Testi, S. and Timm-Heinrich, M. 2012. WEFTA Interlaboratory comparison on total lipid determination in fishery products using the Smedes Method. J. AOAC Int., 95(2): 489-493.

Karl, H.; Roepstorff, A.; Huss, H. and Bloemsma, B. 1995, Survival of *Anisakis* larvae in marinated herring fillets. *Int J Food Sci Technol* 29, 661-670.

Karl, H.; Roepstorff, A.; Huss, H. and Bloemsma, B. 1995. Survival of *Anisakis* larvae in marinated herring fillets. *Int. J. Food. Sci. Tech.*, 29: 661-670.

Kasuya, S.; Hamano, H. and Izumi, S. 1990. Mackerel-induced urticaria and *Anisakis*. *Lancet*, 335: 665.

Kawashima, M.; Arai, K. and Saito, T. 1973. Studies on muscular proteins of fish. IX. An attempt on quantitative determination of actomyosin in frozen surimi from Alaska Pollack. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, 39(2): 207-214.

Kim, Y.; Park, J. and Choi, Y. 2003. New approaches for the effective recovery of fish proteins and their physicochemical characteristics. *Fish. Sci.*, 69: 1231-1239.

King, T.; Hoffman, D.; Lowenstein, H.; Marsh, D.; Platts-Mills, T. and Thomas, W. 1994. Allergen nomenclature. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 105: 224-33.

Kinsella, J. 1982. Relationships between structure and functional properties of food proteins. En: *Food proteins*. Fox, P. and Condon, J. Eds., Applied Science Publishers, London, p 51-103.

Kirstein, F.; Nieuwenhuizen, N.; Worsnell, G.; Brombacher, F.; Mattiucci, S. and Lopata, A. 2007. Different routes of sensitization to *Anisakis pegreffii* in a mouse model of allergic asthma. *Parassitologia*, 49(2): 222.

Kleter, G.; Prandini, A.; Filippi, L. and Marvin, H. 2007 Identification of potentially emerging food safety issues by analysis of reports published by the European Community's Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) during a four-year period. *Food Chem. Toxicol.*, 47(5): 932-50.

- Kobayashi, A.; Kumada, M. and Ishizaki, T. 1972. Evaluation of somatic and “ES” antigens causing immunological injury of mast cells in mice infected with *Anisakis* larvae. Jpn. J. Med. Sci. Biol., 25: 335-344.
- Kobayashi, Y.; Shimakura, K.; Ishizaki, S.; Nagashima, Y. and Shiomi, K. 2007. Purification and cDNA cloning of a new heat-stable allergen from *Anisakis simplex*. Mol. Bioch. Parasitol., 155: 138-145.
- Køie, M.; Berland, B. and Burt, M. 1995. Development to third-stage larva occurs in eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). Can. J. Fish Aquat. Sci., 52 [Suppl 1]:134-139.
- Kurien, B. and Scofield, R. 2009. A brief review of other notable protein detection methods on blots. Methods Mol. Biol., 536: 557-571.
- Lanier, T. 1986. Functional properties of surimi. Food Technol., 40: 107-114.
- Lee, C. 1984. Surimi process technology. Food Technol., 38(11): 69-80.
- Leinemann, M. and Karl, H. 1988. Untersuchungen zur Differenzierung lebender und toter Nematodenlarven (*Anisakis* sp.) in Heringen und Heringserzeugnissen. Arch. Lebensmittelhyg. 39: 133-156.
- Levsen, A. and Lunestad, B. 2010. *Anisakis* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. Vet. Parasitol., 171(3-4): 247-53.
- Levsen, A.; Lunestad, B. and Berland, B. 2005. Low detection efficiency of candling as a commonly recommended inspection method for nematode larvae in the flesh of pelagic fish. J. Food Prot., 68(4): 828-832.

- Lin, R.; Chen, C.; Lee, J.; Lu, C.; Chung, L. and Yen, C. 2010. Larvicidal constituents of *Zingiber officinale* (ginger) against *Anisakis simplex*. *Planta Med.*, 76(16): 1852-1858.
- Lin, T. and Park, J. 1995. Study of myofibrillar protein solubility during surimi processing: effects of washing cycles and ionic strength. Presented at the PFT annual meeting, Mexico.
- Lin, T. and Park, J. 1996. Extraction of proteins from pacific whiting mince at various washing conditions. *J. Food Sci.*, 61: 432-438.
- Liu, G. and Xiong, Y. 2000. Electrophoretic pattern, thermal denaturation on *in vitro* digestibility of oxidized myosin. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 624-630.
- López, I. 2009. Desarrollo de metodologías moleculares para la detección del parasite *Anisakis simplex* en productos derivados de la pesca. Tesis Doctoral. Universidad del País Vasco, España. pp 232.
- Lorenzo, S.; Iglesias, R.; Paniagua, E.; Leiro, J. and Ubeira, F. 1999. Analysis of the antigenicity in mice of biotinyl enzymes from *Anisakis simplex* and other nematodes. *Parasitol. Res.*, 85: 441-445.
- Lozano, J.; Martín, L.; Díaz Sáez, V.; Mañas, I.; Valero, A. and Campos, M. 2004. Cross-reactivity between antigens of *Anisakis simplex* s.l. and other ascarid nematodes. *Parasite*, 11: 219-223.
- MacDonald, G. and Lanier, T. 1991. Carbohydrates as cryoprotectants for meats and surimi. *Food. Technol.*, 45(3): 151-159.
- Manfredi, M.; Crosa, G.; Galli, P. and Ganduglia, S. 2000. Distribution of *Anisakis simplex* in fish caught in the Ligurian Sea. *Parasitol. Res.*, 86: 551-553.

Marques, J.; Cabral, H.; Busi, M. and D'Amelio, S. 2006. Molecular identification of *Anisakis* species from Pleuronectiformes of the Portugeses coast. J. Helminthol., 80: 47-51.

Márquez-Figueroa, Y., Mercedes Cabello, A., Villalobos, L. 2006. Cambios físicos-químicos y microbiológicos observados durante el proceso tecnológico de la conserva de atún. Zootecnia Trop., 24(1): 17-29.

Martín-Sánchez, A.; Navarro, C.; Pérez-Alvarez, J. and Kuri, V. 2009 Alternatives for efficient and sustainable production of surimi: A Review. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8: 359-374.

Martín-Sánchez, J.; Artacho-Reinoso, M.E.; Díaz-Gavilán, M. and Valero-López A. 2005. Structure of *Anisakis simplex* s.l. populations in a region sympatric for *A. pegreffii* and *A. simplex* s.s. Absence of reproductive isolation between both species. Mol. Biochem. Parasitol., 141: 155-162.

Matsumoto, J. 1980. Chemical deterioration of muscle proteins during frozen storage. En: *Chemical deterioration of proteins*. Whitaker, J. and Fujimaki, M. Eds., Am. Chem. Soc. Series (Vol 123), American Chemical Society, Washington D.C., p 95-124.

Matsumoto, J. and Noguchi, S. 1992. Cryostabilitation of protein in surimi. En: *Surimi technology*. Lanier, T. and Lee, C. Eds., Marcel Dekker Inc., New York, p 357-388.

Matsuura, T.; Sun, S. and Sugane, K. 1992. The identity of *Anisakis* type II larvae with *Anisakis physeteris* confirmed by restriction fragment length polymorphism analysis of genomic DNA. J. Helminthol., 66: 33-37.

Mattiucci, S.; Paoletti, M. and Webb, S. 2009. *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. Syst. Parasitol., 74: 199-217.

Mattiucci, S. and Nascetti, G. 2006. Molecular systematics, phylogeny and ecology of anisakid nematodes of the genus *Anisakis* Dujardin, 1845: an update. Parasite, 13: 99-113.

Mattiucci, S. and Nascetti, G. 2008. Advances and trends in the molecular systematics of *Anisakis* nematodes, with implications for their evolutionary ecology and host-parasite coevolutionary processes. Advances in Parasitology, 66: 47-148.

Mattiucci, S.; Abaunza, P.; Ramadori, L. and Nascetti, G. 2004. Genetic identification of *Anisakis* larvae in European hake from Atlantic and Mediterranean waters for stock recognition. J. Fish. Biol., 65: 495-510.

Mattiucci, S.; Cianchi, R.; Nascetti, G.; Paggi, L.; Sardella, N.; Timi, J.; Webb, S.; Bastida, R.; Rodriguez, D. and Bullini, L. 2003. Genetic evidence for two sibling species within *Contracaecum ogmorhini* Johnston & Mawson, 1941 (Nematoda: Anisakidae) from otariid seals of Boreal and Austral regions. Syst. Parasitol., 54: 13-23.

Mattiucci, S.; Farina, V.; Campbell, N.; MacKenzie, K.; Ramosd, P; Pinto, A.; Abaunza, P. and Nascetti, G. 2008. *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. Fish. Res., 89: 146-151.

Mattiucci, S.; Nascetti, G.; Bullini, L.; Orecchia, P. and Paggi, L. 1986. Genetic structure of *Anisakis physeteris* and its differentiation from the *Anisakis simplex* complex (*Ascaridida: Anisakidae*). J. Parasitol., 93: 383-387.

- Mattiucci, S.; Nascetti, G.; Cienchi, R.; Paggi, L.; Arduino, P.; Margolis, L.; Brattey, J.; Webb, S.; D'Amelio, S.; Sorecchia, P. and Bullini, L. 1997. Genetic and ecological data on the *Anisakis simplex* complex with evidence for a new species (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). J. Parasitol., 83: 401-416.
- Mattiucci, S.; Paggi, L.; Nascetti, G.; Abollo, E.; Webb, S.; Pascual, S.; Cianchi, R. and Bullini, L. 2001. Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae). Int. J. Parasitol., 31: 9-14.
- Mattiucci, S.; Paggi, L.; Nascetti, G.; Ishikura, H.; Kikuchi, K.; Sato, N.; Cianchi, R. and Bullini, L. 1998. Allozyme and morphological identification of *Anisakis*, *Contracaecum* and *Pseudoterranova* from Japanese waters (Nematoda, Ascaridoidea). Syst. Parasitol., 40: 81-92.
- Mattiucci, S.; Paggi, L.; Nascetti, G.; Portes Santos, C.; Costa, G.; Di Benedicto, A.; Ramos, R.; Argyrou, M.; Cianchi, R. and Bullini, L. 2002. Genetic markers in the study of *Anisakis typica* (Diesing, 1860): larval identification and genetic relationships with other species of *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae). Syst. Parasitol., 51: 159-170.
- Mattiucci, S.; Paoletti, M.; Consuegra Solorzano, A. and Nascetti, G. 2010. *Contracaecum gibsoni* n. sp. and *C. overstreeti* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from the Dalmatian pelican *Pelecanus crispus* (L.) in Greek waters: genetic and morphological evidence. Syst. Parasitol., 75(3): 207-224.
- Mattiucci, S.; Paoletti, M.; Damiano, S. and Nascetti, G. 2007. Molecular detection of sibling species in anisakid nematodes. Parassitologia, 49: 147-153.

Mendes, R. and Nunes, M. 1992. Characterization of sardine (*Sardina pichardus*) protein changes during surimi preparation. En: *Quality Assurance in the Fish Industry*. Huss, H., Jakobsen, M. and Liston, J. Eds. Elsevier Science, London, GB, p 63-71.

Mladineo, I. 2001. Effects of pH values and temperature changes on migration of *Anisakis simplex* DUJARDIN, 1845 invasive larvae (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in mackerel (*Scomber scombrus*, L.). Acta Adriat. 41: 71-75.

Molday, R. and Maher, P. 1980. A review of cell surface markers and labelling techniques for scanning electron microscopy. Histochem. J., 12: 273-315.

Molina-García, A. and Sanz, P. 2002. *Anisakis simplex* larvae killed by high hydrostatic processing. J. Food Protect., 65: 383-388.

Möller, H. and Anders, K. 1986. Diseases and parasites of marine fishes. Ed. Verlag Möller. Kiel., 165-178.

Moneo, I.; Alday, E.; Sánchez-Agudo, L.; Curiel, G.; Lucena, R. and Calatrava, J. 1995. Skinprick tests for hypersensitivity to alpha-amylase preparations. Occup. Med., 45: 151-155.

Moneo, I. and Caballero, M. 2002. *Anisakis simplex* larvae release allergens during a short incubation in diluted acid which can be used for clinical diagnosis. Alergol. Immunol. Clin., 17: 201-207.

Moneo, I.; Caballero, M.; Gómez, F.; Ortegam, E. and Alonso, M. 2000a. Isolation and characterization of a major allergen from the fishparasite *Anisakis simplex*. J. Allergy Clin. Immunol., 106: 177-82.

- Moneo, I.; Caballero, M. and Jiménez, S. 2000b. Inmunodetección de IgE específica (immunoblotting) en el estudio de la prevalencia de sensibilización a *Anisakis simplex* en España. *Alergol. Inmunol. Clin.*, 15: 255-261.
- Moneo, I.; Caballero, M.; González-Muñoz, M. Rodríguez-Mahillo, A.; Rodríguez-Pérez, R. and Silva, A. 2005. Isolation of a heat resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitol. Res.*, 96: 285-289.
- Moneo, I.; Caballero, M.; Rodríguez-Pérez, R; Rodríguez-Mahillo, A. and González-Muñoz, M. 2007. Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitol. Res.*, 101(4): 1051-1055.
- Montoro, A.; Perteguer, M.; Chivato, I.; Laguna, R. and Cuellar, C. 1997. Recidivous acute urticaria caused by *Anisakis simplex*. *Allergy*, 52: 985-991.
- Moreno, H. 2009. Reestructuración en frío de músculo de pescado mediante la incorporación de alginato sódico y transglutaminasa microbiana. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. pp 402.
- Morris, S. and Sakanari, J. 1994. Characterization of the serine protease and serine protease inhibitor from the tissue-penetrating nematode *Anisakis simplex*. *J. Biol. Chem.*, 269: 27650-27656.
- Morrissey, M.; Lin, J. and Ismond, A. 2005. Waste management and by-products utilization. En: *Surimi and surimi seafood*. Park, J. Ed. 2nd edition, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, Florida, p 279-323.
- Nagasawa, K. and Moravec, F. 1995. Larval anisakid nematodes of Japanese common squid (*Todarodes pacificus*) from the Sea of Japan. *J. Parasitol.*, 81(1): 69-75.

- Navarro, M.; Noguera, M.; Romero, M.; Montilla, M.; González de Selgas, J. and Valero, A. 2008. *Anisakis simplex* s.l.: Larvacidal activity of various monoterpenic derivatives of natural origin against L3 larvae in vitro and in vivo. *Exp. Parasitol.*, 120: 295-299.
- Navarro, M.; Romero, M. C.; Montilla, M. P. and Valero, A. 2010. In vitro and in vivo activity of three sesquiterpenes against L3 larvae of *Anisakis* type I. *Exp. Parasitol.*, 127(2011): 405-408.
- Navone, G.; Sardella, N. and Timi, J. 1998. Larvae and adults of *Hysterothylacium aduncum* Rudolphi, 1802). Nematoda: *Anisakidae* in fishes and crustaceans in South west Atlantic. *Parasite*, 5: 127-136.
- Nguyen, T.; Qasim, M.; Morris, S.; Lu, C.; Hill, D.; Laskowski, M. and Shakanari, J. 1999. Expression and characterization of elastase inhibitors from the ascarid nematodes *Anisakis simplex* and *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 102: 79-89.
- Nilsen, H.; Heia, K.; Sivertsen, A.; Stormo, S. and Elvevoll, E. 2004. Spectral characterisation of cod muscle and nematodes. WEFTA meeting. Lübeck, Germany, pp 220.
- Nishioka, F. 1984. Leaching treatment. En: *Science and Technology of Fish Paste Products*. H. Shimizu, Ed., Tokyo: Koseisha-Koseikaku Publishing Co., p 62-73.
- Niwa, E. 1985. Functional aspect of surimi. En: *Proceedings of the International Symposium on engineered seafood including surimi*. Eds. R.E. Martin y R.L. Collete, National Fisheries Institute. Washington D.C., p 141-147.
- Niwa, E. 1992. Chemistry of Surimi Gelation. En: *Surimi technology*. Lanier, T. and Lee, C. Eds., Marcel Dekker Inc., New York, p 389-420.

Noguchi, S. 1971. The mechanism of prevention of the freezing denaturation of surimi products. *New Food Industry*, 13(12): 56-60.

Noguchi, S. 1984. Frozen surimi. En: *Surimi products-studies and technique*. Shimizu, Y. Ed., Koseisha Koseikaku K.K., Japan, p 49-61.

Noh, J. H.; Kim, B.; Kim, S.; Ock, M.; Park, M. and Goo, J. 2003. A case of acute gastric anisakiasis provoking severe clinical problems by multiple infection. *Korean J. Parasitol.*, 41(2): 97-100.

Northrop, J. 1930. Crystalline pepsin I. Isolation and tests for purity. *J. Gen. Physiol.*, 13: 739-766.

Novotny, A. and Uzzmann, J. 1960. A statistical analysis of the distribution of a larval nematode (*Anisakis sp.*) in the musculature of chum salmon (*Oncorhynchus keta*, Walbaum). *Exp. Parasitol.*, 10: 245-62.

NTP 204.001:1980, (Revisión 2010). Conservas de productos pesqueros. Generalidades. Norma Técnica Peruana. Disponible en:
http://www.indecopi.gob.pe/0/modulos/TIE/TIE_DetallarProducto.aspx?PRO=6432

NTP 204.002:1981. Conserva de pescado. Clasificación de acuerdo a la presentación del contenido. Norma Técnica Peruana. Disponible en:
http://www.indecopi.gob.pe/0/modulos/TIE/TIE_DetallarProducto.aspx?PRO=1910

Okada, M. 1967. Elastic property of kamaboko (Fish meat jelly). *Bulletin of the Tokai Reference Fisheries Research Laboratory*, 36: 121-122.

Okada, M. 1981. Theory and practice of manufacturing fish gel products. En: *Fish gel products*. Kinumaki, T.; Okada, M. and Yokozeki, G., Eds. Koseisha, Koseikaku, Japan.

- Oliver, C. 2010. Conjugation of colloidal gold to proteins. *Immunocytochemical Methods and Protocols. Method. Mol. Biol.*, 588(5): 369-373.
- Osanz Mur, A. 2001. Presencia de larvas de anasákidos (Nematoda: *Ascaroidea*) en pescado de consumo capturado en la zona pesquera de Tarragona. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria.
- Oshima, T. 1972. *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent area. *Prog. Med. Parasitol.*, 4: 301-393.
- Owusu-Ansah, Y. and Hultin, H. 1992. Differential insolubilization of red hake muscle proteins during frozen storage. *J. Food Sci.* 57: 265-266.
- Padovani, R. 2003. Efeito da radiação gama in vitro nas larvas de *Anisakis* sp coletadas de congros *Genypterus brasiliensis* Regan 1903. Universidade Federal Fluminense, Niteroi, Brasil. pp 55.
- Palashoff, M. 2008. Determining the specificity of pepsin for proteolytic digestion. Chemistry Master's Theses, Northeastern University. Disponible en: http://iris.lib.neu.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1000&context=chemistry_theses
- Paltridge, G. 1984. Anisakiasis: a New Zealand disease. *New Zeal. Med. J.*, 97: 558-559.
- Pardo-Gandarillas, M.; Lohrmann, K.; Valdivia, A. and Ibañez, C. 2009. First record of parasites of *Dosidicus gigas* (d' Orbigny, 1835) (Cephalopoda: Ommastrephidae) from the Humboldt Current system off Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 44(2): 397-408.
- Park, J. and Morrissey, M. 2000. Manufacturing of surimi from light muscle fish. En *Surimi and surimi seafood*. Park, J. Ed. Marcel Dekker Inc. New Marcel Dekker Inc. New York, p 23-58.

Park, J. 1994. Cryoprotection of muscle proteins by carbohydrates and polyalcohols-a review. *J. Aquatic Food Product. Tech.*, 3:23-41.

Park, J. 2005. Surimi Resources. En: *Surimi and surimi seafood*. Park, J. Ed. 2nd edition, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, Florida, p 3-29.

Park, J. and Lin, J. 2005. Surimi: Manufacturing and evaluation. En: *Surimi and surimi seafood*. Park, J. Ed. 2nd edition, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, Florida, p 33-106.

Park, J.; Lanier, T. and Green, D. 1988. Cryoprotective effects of sugar, polyols, and/or phosphates on Alaska Pollack surimi. *J. Food Sci.*, 53: 1-3.

Park, J.; Lin, T. and Yongsawatdigul, J. 1997. New developments in manufacturing of Surimi and Surimi seafood. *Food Rev. Int.*, 13(4): 577-610.

Paulson, D.; Wilson, R. and Spatz, D. 1984. Crossflow membrane technology and its applications. *Food Technol.*, 38(12): 77-87, 111.

Pereira Bueno, J. 1992. Algunos aspectos de la epidemiología y prevención de la anisakiosis. Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social. Dirección General de Salud Pública. pp 64.

Pérez-Pérez, J.; Fernández-Caldas, E.; Marañón, F.; Sastre, J.; Bernal, M.; Rodríguez, J. and Bedate, C. 2000. Molecular cloning of paramyosin, a new allergen of *Anisakis simplex*. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 123: 120-129.

Perteguer, M.; Raposo, R. and Cuellar, C. 1996. In vitro study on the effect of larval excretory/secretory products and crude extracts from *Anisakis simplex* on blood coagulation. *Int. J. Parasitol.*, 26(1): 105-108.

Petrie, A.; Wootten, R.; Bruno, D.; MacKenzie, K. and Bron, J. 2007. A survey of *Anisakis* and *Pseudoterranova* in Scottish fisheries and the efficacy of current detection methods. FSAS Project S14008.

Phatcharat, S.; Benjakul, S. and Visessanguan, W. 2006. Effects of washing with oxidising agents on the gel-forming ability and physicochemical properties of surimi produced from bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). Food Chem., 98(3): 431-439

Pinkus, G. and Coodlige, C. 1975. Intestinal Anisakiasis. First case report from North America. Am. J. Med., 59(1): 114-120.

Pippy, J. 1970. Use of ultraviolet light to find parasitic nematodes in situ. J. Fish. Res-Bd. Can., 27: 963-965.

Poms, R.; Klein, C. y Anklam, E. 2004. Methods for allergen analysis in food: a review. Food Addit. Contam., 21: 1-31.

Pontes, T.; D'Amelio, S.; Costa, G. and Paggi, L. 2005. Molecular characterization of larval anisakid nematodes from marine fishes of Madeira by a PCR-based approach, with evidence for a new species. Parasitol., 91: 1430-1434.

Puente, P.; Anadón, A.; Rodero, M.; Romarís, F.; Ubeira, F. and Cuéllar, C. 2008. *Anisakis simplex*: the high prevalence in Madrid (Spain) and its relation with fish consumption. Exp. Parasitol., 118(2): 271-274.

Quiazon, K.; Yoshinaga, T. and Ogawa, K. 2011. Experimental challenge of *Anisakis simplex* sensu strict and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. Parasitol Int., 60: 126-131.

Quijada, J.; Lima dos Santos, C. y Avdalov, N. 2005. Enfermedades parasitarias por consumo de pescado. Incidencia en América Latina. INFOPESCA Internacional 24: 16-23.

Real Decreto 1437/92 de 27 de noviembre, por el que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y comercialización de los productos pesqueros y de la acuicultura. Boletín Oficial del Estado, BOE 11 de 13.01.93. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/1993/01/13/pdfs/A00808-00820.pdf>

Real Decreto 1420/2006 de 1 de diciembre, sobre prevención de la parasitosis por *Anisakis* en productos de la pesca suministrados por establecimientos que sirven comida a los consumidores finales o a colectividades. Boletín Oficial del Estado, BOE 302 de 19.12.06. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2006/12/19/pdfs/A44547-44549.pdf>

Reglamento 1276/2011 de la comisión de 8 de diciembre de 2011 que modifica el anexo III del Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente al tratamiento para matar parásitos viables en los productos de la pesca destinados al consumo humano. Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE L327/39 de 9.12.2011. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:327:0039:0041:ES:PDF>

Reglamento 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE L139/55 de 30.04.2004. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:ES:PDF>

Reglamento 854/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 29 de abril de 2004 por el que se establecen normas específicas para la organización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano Diario Oficial de la Unión Europea, DOUE L139/206 de 30.4.2004. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0206:0320:ES:PDF>

Rodríguez, E.; Anadón, A.; García-Bodas, E.; Romaris, F.; Iglesias, R.; Garate, T. and Ubeira, F. 2008. Novel sequences and epitopes of diagnostic value derived from the *Anisakis simplex* Ani s 7 major allergen. *Allergy*, 63(2): 219-225.

Rodríguez, E.; Romaris, F.; Lorenzo, S.; Moreno, J.; Bonay, P.; Ubeira, F. and Garate, T. 2006. A recombinant enolase from *Anisakis simplex* is differentially recognized in natural human and mouse experimental infections. Med. Microbiol. Immunol. (Berl), 195: 1-10.

Rodríguez-Mahillo A.; González-Muñoz, M.; De las Heras, C.; Tejada, M. and Moneo, I. 2010. Quantification of *Anisakis simplex* allergens in fresh, long-term frozen and cooked fish muscle. Foodborne Pathog. Dis., 7(8): 967-973.

Rodríguez-Mahillo, A. 2006. Clonación y caracterización de alérgenos recombinantes de *Anisakis simplex*. Valoración de su utilidad en el diagnóstico de la Anisakiasis. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, España. pp 131.

Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M.; Gómez-Aguado, F.; Rodríguez-Pérez, R.; Corcuera, M.; Caballero, M. and Moneo, I. 2007. Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s4 as a cysteine-protease inhibitor. Int. J. Parasitol., 37: 907-917.

Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M.; Moneo, I.; Solas, M.; Mendizábal, A.; De las Heras, C. and Tejada, M. 2008. Allergenic properties and cuticle microstructure of *Anisakis simplex* L3 after freezing and pepsin digestion. J. Food Prot., 71(12): 2578-2581.

Rodríguez-Mahillo, A.; Tejada, M.; González-Muñoz, M.; Moneo, I. y Solas, M. 2011. Patente N° 2 340 978. Método de extracción y detección de antígenos de *Anisakis* en alimentos destinados al consumo humano o animal.

Rodríguez-Pérez R.; Moneo I.; Rodríguez-Mahillo A.; Caballero M. 2008. Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. Mol. Biochem. Parasitol., 159(2): 92-97.

- Roepstorff, A.; Karl, H.; Bloemsma, B. and Huss, H. 1993. Catch handling and possible migration of *Anisakis* larvae in herring (*Clupea harengus*). J. Food Protect., 56: 783-787.
- Rojas, Y.; Falcón, V.; Legrá, M. y Santizo, C. 1994. Obtención y caracterización de un anticuerpo monoclonal marcado con oro coloidal. Biotecnología aplicada, 11(2): 189-191.
- Roth, J. 1983. The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry. En: *Techniques in immunocytochemistry*. Bullock, G. and Pełrusz, P. Eds., Academic Press, London. p 217-284.
- Rückert, S.; Klimpel, S.; Al-Quraishy, S.; Mehlhorn, H. and Palm, H. 2008. Transmission of fish parasites into grouper mariculture [Serranidae: *Epinephelus coioides* (Hamilton, 1822)] in Lampung Bay, Indonesia. Parasitol. Res., 104: 523-532.
- Ruiz-Capillas, C and Moral, A. 2001. Residual effect of CO₂ on hake (*Merluccius merluccius* L.) stored in modified and controlled atmospheres. Eur. Food Res. Tech., 212(4): 413-420.
- Ruiz-Capillas, C. and Moral, A. 2005. Sensory and biochemical aspects of quality of whole bigeye tuna (*Thunnus obesus*) during bulk storage in controlled atmospheres Food Chem., 89(3): 347-354.
- Ruíz-Valero, J.; Valero, A.; Adroher, F. y Ortega, J. 1992. Presencia de ascáridos en peces comerciales de frecuente consumo en Granada. En: Memoria al profesor Doctor DF. de P. Martín Gómez; Hernández, S. Ed.; Universidad de Córdoba, Córdoba, España. pp. 335-349.
- Sainclivier, M. 1985. L'industrie alimentaire halieutique. Des techniques ancestrales à leurs réalisations contemporaines salage, séchage, fumage, marinage, hydrolysats 2.

- Sánchez-Monsalvez, I.; De Armas-Serra, C.; Martínez, J.; Dorado, M.; Sánchez, A. and Rodríguez-Caabeiro, F. 2005. A New procedure for marinating fresh anchovies and ensuring the rapid destruction of *Anisakis* Larvae. J. Food Protect., 68(5): 1066-1072.
- Sano, T. 1988. Thermal Gelation of fish muscle proteins. Tesis Doctoral. Laboratory of Biochemistry. Department of Chemistry. Faculty of Science and Technology. Sophia University, Tokyo (Japón).
- Sathe, S. and Sharma, G. 2009. Effects of food processing on food allergens. Mol. Nutr. Food Res., 53: 970-978.
- Sathe, S.; Teuber, S. and Roux, K. 2005. Effects of food processing on stability of food allergens. Biotech. Adv., 23: 423-429.
- Schagger, H and Von Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecil sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem., 166: 368-379.
- Seo, M.; Kho, B.; Guk, S.; Lee, S. and Chai, J. 2006. Radioresistance of *Anisakis simplex* third-stage larvae and the possible role of superoxide dismutase. J. Parasitol., 92: 416-418.
- Shih, H.; Ku, C. and Wang, C. 2010. *Anisakis simplex* (Nematoda: Anisakidae) third-stage larval infections of marine cage cultured cobia, *Rachycentron canadum* L., in Taiwan. Vet. Parasitol., 171(3-4): 277-285.
- Shimakura, K.; Miura, H.; Ikeda, K.; Ishizaki, S.; Nagashima, Y.; Shirai, T.; Kasuya, S. and Shiomi, K. 2004. Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. Mol. Biochem. Parasitol., 135: 69-75.

- Shimizu, Y. 1965. Manufacturing method of leached meat. Off. Bull. Jap. Pat., Sho 40-21224.
- Shimizu, Y. and Toyohara, H. 1992. Fish jelly products. JICA, Japan International Cooperation Agency.
- Sikorski, Z. and Kolakowska, A. 1994. Changes in protein in frozen stored fish. En: *Seafood proteins*. Sikorski, Z. and Sun Pan, B. Eds., Chapman and Hall, New York, USA, p 99-112.
- Silva, M. and Eiras, J. 2003. Ocurrance of *Anisakis sp.* In fishes of the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential. Bull. Eur. Fish. Pathol. 23,13-17.
- Smedes, F. 1999. Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. Analyst, 124: 1711-1718.
- Smith, J. 1971. *Thysanoessa inermis* and *T. longicaudata* (Euphausiidae) as first intermediate hosts of *Anisakis* sp. (Nematoda: Ascaridata) in the Northern Sea, to the north of Scotland and at Faroe. Nature, 234: 478.
- Smith, J. 1983. *Anisakis simplex*. (Rudolphi, 1809, del Krabbe, 1878) (Nematoda: *Ascaroidea*): morphology and morphometry of larvae from euphausiids and fish, and a review of the life-history and ecology. J. Helminthol., 57: 205-224.
- Smith, J. 1984. The abundance of *Anisakis simplex* L3 in the body cavity and flesh of marine teleosts. Int. J. Parasitol., 14: 491-495.
- Smith, J. and Wootten, R. 1975. Experimental studies on the migration of *Anisakis sp.* Larvae (Nematoda: *Ascaridida*) into the flesh of herring *Clupea harengus*. Int. J. Parasitol., 5: 133-136.

- Smith, J. and Wootten, R. 1978. *Anisakis* and Anisakiasis. Advances in Parasitology. Volume 16. Academic Press.
- Smith, J. and Wootten, R. 1984. Parasitose des poissons par les larves du nematode *Anisakis*. Fiches d'identification des Maldies et Parasites des Poissons, Crustacees et Molusques. No. 8, pp. 4.
- Smith, J.; Billings, G. and Yada, R. 1991. Chemical modification of amino groups in mucor miehei aspartyl proteinase, porcine pepsin, and chymosin. I. Structure and function. Agric. Biol. Chem., 55: 2009-2016.
- Solas, M.; García, M.; De las Heras, C.; Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz M.; Moneo, I.; Mendizábal, A. and Tejada, M. 2009. *Anisakis simplex* antigens in fresh and frozen-thawed muscle of anchovies in vinegar. Food Sc. Tech. Int., 15(2): 139-148.
- Solas, M.; García, M.; Rodriguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, A.; De las Heras, C. and Tejada, M. 2008. *Anisakis* antigens detected in fish muscle infested with *Anisakis simplex* L3. J. Food Prot., 71(6): 1273-1276.
- Sonu, S. 1986. Surimi. NOAA Technical Memorandum National Marine Fisheries Service (NMFS), Terminal Island, USA.
- Stormo, S.; Ernsten, A.; Nilsen, H.; Heia, K. Sivertsen, A. and Elvevoll, E. 2004. Compounds of parasitic roundworm absorbing in the visible region: Target molecules for detection of roundworm in Atlantic cod. J. Food Protect., 67(7): 1522-1525.
- Sultanbawa, F. 1999. Effectiveness of polyol blends as cruorpotectants in surimi and ntural actomyosin from Ling cod (*Ophiodon elongatus*). Thesis, The University of British Columbia.

Suzuki, T. 1981. Fish and Krill Protein: Processing Technology. Applied Science Publ., Ltd., Essex, UK.

Suzuki, T.; Sato, Y.; Yamashita, T.; Sekikawa, H. and Otsuru, M. 1974. Anisakiasis: preparation of a stable antigen for indirect fluorescent antibody test. *Exp. Parasitol.*, 35: 418-424.

Taylor, S. 2006. The nature of food allergy. En: *Detecting allergens in food*. Koppelman, S y Hefle, S. Ed. Woodhead Publishing Ltd & CRC Press LLC, England, p 3-20.

Tejada, M. 1991. Tendencias actuales en la utilización de surimi. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 31(3): 310-318.

Tejada, M. 1994. Gelation of myofibrillar fish proteins. *Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment.* 34(3): 257-273.

Tejada, M. 2001. Aggregation of myofibrillar proteins during frozen storage of fish. En: *Novel Processes and Control Technologies in the Food Industry*. NATO Scientific Series, Vol 338, Series 1: Life and Behavioural Sciences. Bozoglu, F. Deak, T. and Ray, B. Eds., IOS Press, Amsterdam, p 212-226.

Tejada, M. 2009. *Anisakis*: efecto de los tratamientos dados al pescado en las larvas y en sus alérgenos. *Alim. Nutri. Salud.* 16(3): 71-83.

Tejada, M. y Borderías, J. 1987. Productos derivados del surimi. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 27(2): 161-172.

Tejada, M. y López, J. 2012. Evaluación de la presencia de Nematodos del género *Anisakis* en los pescados de acuicultura marina españoles. Informe Final, APROMAR. Ayuda para acciones colectivas de interés público. Secretaría General del Mar. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. España. pp 42. Disponible en:
<http://www.apromar.es/Proyecto-Anisakis/APROMAR-Informe-ANISAKIS-2012.pdf>

Tejada, M.; Álvarez, C.; Martín, O. y Barbosa-Cánovas, G. 1995. Influencia del tratamiento térmico y la humedad en la calidad de los geles de surimi de tilapia. Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Aliment., 35(3): 297-312.

Tejada, M.; Careche, M.; Torrejón, P.; Del Mazo, M.; Solas, M.; García, M.; Barba, C. 1996. Protein extracts and aggregates forming in minced cod (*Gadus morhua*) during frozen storage. J. Agric. Food Chem., 44: 3308-3314.

Tejada, M.; Mohamed, G. Huidobro, A. and García, M. 2003a. Effect of frozen storage of hake, sardine and mixed minces on natural actomyosin extracted in salt solutions. J. Sci. Food Agric., 83: 1380-1388.

Tejada, M.; Huidobro, A. and Fouad Mohamed, G. 2003b. Comparison of gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and hake (*Merluccius merluccius*) muscle proteins during iced and frozen storage. J. Sci. Food Agric., 83(2): 113-122.

Tejada, M.; Karl, H.; De las Heras, C.; Vidaček, S.; Solas, M. and García, M. Does the intensity of *Anisakis* infection affect the quality of hake muscle?. J Aquat. Food Prod Tech. (en prensa).

Tejada, M.; Solas, M.; De las Heras, C.; Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz M; Moneo, I. and Mendizábal, A. 2007. Antigenic activity of *Anisakis* larvae is conserved after food processing and pepsin treatments. Parassitologia, 49(2): 406.

- Tejada, M.; Solas, M.; Navas, A. and Mendizábal, A. 2006a. Scanning Electron Microscopy of *Anisakis* Larvae following Different Treatments. J. Food Protect., 69(6): 1379-1387.
- Tejada, M.; Solas, M.; Navas, A and Mendizábal, A. 2006b. Effect of freezing and different heat treatments on *Anisakis* larvae: preliminary study. In “Seafood research from fish to dish” Quality, safety and processing of wild and farmed fish. J.B. Luten; C. Jacobsen; K. Bekaert; A. Sæbø; J. Oehlenschläger Eds. Wageningen Academic Publishers, 309-316.
- Torrejón, P. 2002. Agregación de proteínas de musculo de pescado congelado. Acción del formaldehído. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. pp 295.
- Torrejón, P.; Del Mazo, M.; Tejada, M. and Careche, M. 1999. Aggregation of minced hake during frozen storage. Eur. Food. Res. Technol., 209: 209-214.
- Toyoda, K.; Kimura, I.; Fujita, T.; Noguchi, S. and Lee, C. 1992. The surimi manufacturing process. En: *Surimi technology*. Lanier, T. and Lee, C. Eds., Marcel Dekker Inc., New York, p 79-116.
- Tsukamasa, Y. and Shimizu, Y. 1990. Setting property of sardine and Pacific mackerel meat. Nippon Suisan Gakkaishi, 56: 1105-1112.
- Umehara, A.; Kawakami, Y.; Matsui, T.; Araki, J. and Uchida, A. 2006. Molecular identification of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) from fish and cetacean in Japanese waters. Parasitol. Int., 55: 267-271.
- Uresti, R.; Velázquez, G.; Vázquez, M.; Ramírez, J. A. and Torres, J. 2006. Effects of combining microbial transglutaminase and high pressure processing treatments on the mechanical properties of heat-induced gels prepared from arrowtooth flounder (*Atheresthes stomias*). Food Chem., 94: 202-209.

USDA. 2011. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. Nutrient Data Laboratory Home Page. Diponible en: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>

Valero, A.; López-Cuello, M.; Benítez, R. and Adroher, F. 2006 *Anisakis* spp. in European hake, *Merluccius merluccius* from the Atlantic off north-west Africa and the Mediterranean of southern Spain. W. Acta Parasitológica, 51(3): 209-212.

Valero, A.; Martín-Sánchez, J.; Reyes-Muelas, E. and Adroher, F. 2000. Larval anisakids parasitizing the blue whiting, *Micromesistius poutassou*, from Motril Bay in the Mediterranean region of southern Spain. J. Helminthol., 74: 361-364.

Valero, A.; Paniagua, M.; Hierro, I.; Díaz, V.; Valderrama, J.; Benítez, R. and Adroher, F. 2006. Anisakid parasites of two forkbeards (*Phycis blennoides* and *Phycis phycis*) from the Mediterranean coasts of Andalucía (Southern Spain). Parasitol. Int., 55: 1-5.

Valero, A.; Pérez, P.; Gonzalez, M.; Cabo, M.; Montilla, M. and Navarro, M. 2004 Action of different monoterpenic compounds against *Anisakis simplex* s.l. L3 larvae. Phytomedicine, 11:, 77-82.

Valls, A.; Pascual, C. and Martin Esteban, M. 2005. *Anisakis* allergy: an update. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique, 45: 108-113.

Valls, A.; Pascual, C. and Martin Esteban, M. 2003. *Anisakis* and anisakiosis. Allergol Immunopathol., 31: 348-55.

Van Hengel, A. 2007. Food allergen detection methods and the challenge to protect food allergic consumers. Anal. Bioanal. Chem., 389: 11-118.

Van Thiel, P. 1960. *Anisakis*. Parasitology, 53: 16.

- Van Thiel, P.; Kuipers, F. and Roskam, R. 1962. A nematode parasitic to herring causing acute abdominal syndromes in man. *Trop. Geogr. Med.*, 2: 97-113.
- Ventura, M.; Tummolo, R.; Di Leo, E.; D' Ersasmo, M. and Arsieni, A. 2008. Immediate and cell-mediated reactions in parasitic infections by *Anisakis simplex*. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 18: 253-259.
- Vidaček, S.; De las Heras, C. and Tejada, M. 2009a. Quality of fish muscle infested with *Anisakis simplex*. *Food Sci. Technol. Int.*, 15(3): 283-290.
- Vidaček, S.; De las Heras, C.; Solas, M.; García, M.; Mendizábal, A. and Tejada M. 2011. Viability and antigenicity of *Anisakis simplex* after conventional and microwave heating at fixed temperatures. *J. Food Protect.* 74 (12): 2119-2126.
- Vidaček, S.; De las Heras, C.; Solas, M.; Mendizabal, A.; Rodríguez-Mahillo, A.; González-Muñoz, M. and Tejada, M. 2009b. *Anisakis simplex* allergens remain active after conventional or microwave heating and pepsin treatments of chilled and frozen L3 larvae. *J. Sci. Food Agric.*, 89: 1997-2002.
- Vidaček, S.; De las Heras, C.; Solas, M.; Mendizábal, A.; Rodríguez-Mahillo, A. and Tejada, M. 2010. Antigenicity and Viability of *Anisakis* larvae heated at different time-temperature conditions. *J. Food Protect.*, 73(1): 62-68.
- Vidaček, S.; De las Heras, C.; Solas, M.; Rodríguez-Mahillo, A. and Tejada, M. 2009c. Effect of high hydrostatic pressure on mortality and allergenicity of *Anisakis simplex* L3 and on muscle properties of infested hake. *J. Sci. Food Agric.*, 89(13): 2228-2235.
- Vyncke, W. 1981. Influence of Citric-Acid on the shelf life of Saithe and Redfish. *Revue De L Agriculture*, 34(1): 149-154.

Ward, D.; Bernard, D.; Collette, R.; Kraemer, D.; Hart, K.; Price, R. and Otwell, S. 1997. Hazards Found in Seafoods, Appendix III. En: *HACCP: Hazard Analysis and Critical Control Point Training Curriculum*. 2nd Ed. UNC-SG-96-02; North Carolina Sea Grant, Raleigh, NC, p 173-188.

Warne, D. 1989. Manual on fish canning. FAO Fisheries Technical Paper-285 Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

WHO, World Health Organization. 1995. Control of foodborne trematode infections: report of a WHO study group. WHO, Geneva. WHO Technical Report Series N° 849.

Wilson, E. and Burns, D. 1983. Kiwifruit juice processing using heat treatment techniques and ultrafiltration. *J. Food Sci.*, 48: 1101-1105.

Wootten, R. and Cann, D. 2001. Round worms in fish Marine Laboratory of the Department of Agriculture and Fisheries for Scotland and the Torry Research Station of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Food.

Yamamoto, T., 1974. Frozen Surimi and Kneaded Seafoods. *Reito Surimi-to Suisan Neriseihin* . Nippon Shokuhin Keizai (N.S.K.) Sha Co., Tokyo. pp 233.

Young, K. and White, J. 1985. Colour measuremet of fish minces using Hunter L, a, b values. *J. Sci. Food Agric.*, 36: 383-392.

Yubero, F.; Auroux, F. and Adela y López, V. 2004. Anisákidos parásitos de peces comerciales. Riesgos asociados a la salud pública. *Anales de la real academia de ciencias veterinarias de Andalucía oriental*, 17(1).

ANEXO 1. ABREVIATURAS

Ac	Actina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
B	Salmuera (Brine)
BCIP/NBT	5-Bromo-4-Cloro-3-Indol Fosfato/Nitroazul de Tetrazolio
C	Conservación en congelación (-20±2°C)
CC	Línea de cocido (Canned Cook)
CEE	Comunidad Económica Europea
CETPEC	Centro Tecnológico de la Pesca
CIII	Hospital Carlos III
CNME	ICTS Centro Nacional de Microscopía Electrónica, Universidad Complutense de Madrid
CP1	Surimi 1, con crioprotector 1 (Sacarosa 4% y Sorbitol 4%)
CP2	Surimi 2, con crioprotector 2 (Sacarosa 4%, Sorbitol 4% y Tripolifosfato de sodio 0,2%)
CR	Línea de crudo (Canned Raw)
Cys	Cisteína
D	Digestión con pepsina
D+C	Digestión mas Calentamiento
DNasa	Desoxirribonucleasa
DOCE	Diario Oficial de la Unión Europea
DOUE	Diario Oficial de la Unión Europea (antes DOCE)
DR	Deformación a la rotura
DB	Inmunodetección por Dot blot

E	Extractos finales obtenidos en la extracción para inmunodetección
EDTA	Ácido etilén diamino tetra-acético
EF	Electroforesis en geles de poliacrilamida con Dodecil sulfato sódico
EFSA	European Food Safety Authority
ESEM	Microscopía electrónica de barrido ambiental
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Administration de EEUU
FR	Fuerza a rotura
G1	Gel 1, elaborado a partir del surimi 1 y mezclado con cloruro de sodio (2,5%)
G2	Gel 2, elaborado a partir del surimi 2 y mezclado con cloruro de sodio (2,5%)
G3	Gel 3, elaborado a partir del surimi 1 y mezclado con cloruro de sodio (2,5%) y citral (0,1%)
H	Tratamiento térmico máximo 115°C durante 70 minutos (H)
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
ICTAN	Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición
ID	Inmunodetección
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
IHC	Inmunohistoquímica
IUIS	International Union of Immunological Societies
L	Tratamiento térmico mínimo 113°C durante 40 minutos (Low)
LG	Líquido de gobierno
M	Marinado (Marinated)
ME	Músculo esterilizado

MHC	Cadena pesada de miosina
ML	Músculo obtenido después 3° lavado
MNCN	Museo Nacional de Ciencias Naturales
MP	Músculo infestado sin tratamiento (Control)
NaCl	Cloruro de sodio
NaClO	Hipoclorito de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NAM	Actomiosina natural
NC	Nitrocelulosa
Ni	Número de partículas de oro coloidal
Ns	Número de partículas de oro coloidal por unidad de superficie
O	Aceite (Oil)
P	Precipitados obtenidos en la extracción para inmunodetección
PB	Proteína bruta
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
-PO ₄ H ₂	Ortofosfato o fosfato di ácido
PS/PT	Solubilidad proteica o Proteína soluble en soluciones salinas
R	Refrigeración (5±1°C)
rADN	Ácido desoxirribonucleico recombinante
RG	Resistencia del gel
Rn	Residuo del tamizado
RNasa	Ribonucleasa
S1	Solución obtenidos después del 1° lavado del músculo

S2	Solución obtenidos después del 2º lavado del músculo
S3	Solución obtenidos después del 3º lavado del músculo
Sa	Área estándar
SA	Sacarosa
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con Dodecil sulfato sódico
SEM	Microscopía electrónica de barrido
-SH	Grupo sulfhidrilo
SO	Sorbitol
STPP	Tripolifosfato de sodio
TCA	Acido tricloroacético
Tn	Músculo tamizado
Tris-HCl	Tris (hidroximetil) aminometano clorhídrico.
TTBS	Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%
UE	Unión Europea
UF	Ultrafiltración
UV	Luz ultravioleta
WB	Inmunodetección por Western blot
β-ME	β-mercaptoetanol

ANEXO 2. LISTADO DE TABLAS

1 INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1	Clasificación morfológica de <i>Anisakis</i> según Shikari (1974)	13
Tabla 1.2	Principales especies portadoras de larvas de Anisákidos	20
Tabla 1.3	Distribución geográfica y prevalencia de especies portadoras de <i>A. simplex</i>	21
Tabla 1.4	Principales características de las proteínas alergénicas de <i>Anisakis</i>	46

4 APLICACIÓN DE PROCESOS TECNOLÓGICOS PARA REDUCIR O ELIMINAR LA ALERGENICIDAD

Tabla 4.1	Cuantificación por Dot blot de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) en extractos para inmunodetección sometidos a tratamientos de digestión y calentamiento	106
------------------	---	-----

5 APLICACIÓN DE PROCESOS TECNOLÓGICOS PARA REDUCIR O ELIMINAR LA ALERGENICIDAD

5.1 Sistemas modelo de tratamiento térmico de esterilización en productos de la pesca

Tabla 5.1	Descripción de los lotes y tratamientos aplicados a larvas L3 de <i>Anisakis</i> y músculo de atún infestado artificialmente	119
Tabla 5.2	Análisis elementales y pH de músculo de atún	123
Tabla 5.3	Densidad de etiquetado (Ns) y tasa residual de alérgenos (%) de Ani s 4 en músculo de atún infestado artificialmente (lote 1) sometido a diferentes condiciones de tratamiento térmico	124
Tabla 5.4	Densidad de etiquetado (Ns) y tasa residual de alérgenos (%) de Ani s 4 en larvas L3 de <i>Anisakis simplex</i> s.s. y músculo de atún infestado artificialmente (lote 2) sometidos a diferentes condiciones de tratamiento térmico	127

5.2 Estudio compartivo en el tiempo en músculo congelado con infestación natural y artificial

Tabla 5.5	Análisis elemental y pH en lotes de merluza con infestación natural y artificial (≈ 12 larvas/100 g músculo) estudiados en refrigeración ($5\pm 1^\circ\text{C}$) y a los 406 días de conservación en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$)	142
------------------	---	-----

Tabla 5.6	Densidad de etiquetado (Ns) con antígenos de Anisakis 4 en precipitados obtenidos de la extracción para inmunodetección de músculo de merluza con infestación natural y artificial (≈ 12 larvas/100 g músculo) y conservado en congelación ($-20 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 106 y 293 días.....	150
5.3.2.2 Lavados sucesivos tipo surimi y selección de soluciones de lavado		
Tabla 5.7	Porcentaje (%) de humedad y proteína y pH de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) y de las diferentes fracciones obtenidas en los lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^\circ\text{C}$) con diferentes soluciones	191
5.3.3 Lavados sucesivos en músculo infestado refrigerado y en músculo infestado conservado en congelación		
Tabla 5.8	Porcentaje (%) de humedad y proteína y valores de pH de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) y de las diferentes fracciones obtenidas en los lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^\circ\text{C}$) con diferentes soluciones.....	208
5.3.4 Elaboración de surimi y efecto de la conservación en congelación		
Tabla 5.9	Porcentaje (%) de humedad y proteína y valores de pH de surimis refrigerados ($5 \pm 1^\circ\text{C}$, 1 día).....	224
5.3.5 Elaboración de geles y efecto de la conservación en congelación de geles		
Tabla 5.10	Porcentaje (%) de humedad y proteína y valores de pH de geles elaborados surimis refrigerados ($5 \pm 1^\circ\text{C}$, 1 día).....	238

ANEXO 3. LISTADO DE FIGURAS

1 INTRODUCCIÓN

Figura 1.1	Especies del género <i>Anisakis</i> obtenidas por análisis genéticos.....	11
Figura 1.2	Imágenes de larvas de <i>Anisakis simplex</i>	12
Figura 1.3	Huéspedes definitivos de <i>Anisakis</i> spp.	15
Figura 1.4	Ciclo biológico de <i>Anisakis</i> spp.	16
Figura 1.5	Distribución geográfica de <i>Anisakis</i> spp.	18
Figura 1.6	Larvas de <i>A. simplex</i> en merluza (<i>Merluccius merluccius</i>) y en manto de calamar gigante (<i>Dosidicus gigas</i>).....	23

3 MATERIALES Y MÉTODOS GENERALES

Figura 3.1	Recepción y tratamiento de muestras en planta piloto	68
-------------------	--	----

4 EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ANTÍGENOS Y ALÉRGENOS DE ANISAKIS

Figura 4.1	Esquema de la modificación de los parámetros de sonicación durante la extracción de proteínas para inmunodetección de músculo de merluza con infestación natural controlada (≈ 15 larvas/100 g músculo)	88
Figura 4.2	Contenido de proteína bruta (g kg^{-1}) de los precipitados (P) obtenidos en la extracción para inmunodetección (ID) a partir de músculo de merluza con infestación controlada (≈ 15 larvas/100 g músculo) y sometidos a diferentes condiciones de sonicación	92
Figura 4.3	Microscopia electrónica de barrido (SEM) de los precipitados (P) obtenidos en la extracción para inmunodetección (ID) a partir de músculo de merluza con infestación natural controlada (≈ 15 larvas/100 g músculo) y sometido a diferentes condiciones de sonicación.	93
Figura 4.4	Microscopia electrónica de barrido (SEM) del cuerpo fraccionado de una larva de <i>Anisakis</i> encontrada en el precipitado (P) de músculo de merluza sonificado a 25 W, 30 s durante la extracción para inmunodetección (ID)	94
Figura 4.5	Inmunodetección por Western blot de <i>Anisakis</i> 4 en extractos finales (E) de músculo de merluza con infestación controlada (≈ 15 larvas/100 g músculo) y sometido a diferentes condiciones de sonicación.....	94
Figura 4.6	Cuantificación por Dot blot de Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) de extractos finales (E) de músculo de merluza con infestación controlada (≈ 15 larvas/100 g músculo), congelado a $-20 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 300 días y sometido a diferentes condiciones de sonicación.....	96

Figura 4.7	Esquema de la extracción de proteína para inmunodetección a partir de músculo de merluza con infestación artificial (50 larvas/100 g músculo) y sometidos a tratamientos de digestión y digestión más calentamiento	100
Figura 4.8	Proteína bruta (%) de los precipitados (P) y extractos finales (E) de inmunodetección (ID) sometidos a diferentes tratamientos de digestión con pepsina y digestión con pepsina más calentamiento, obtenidos a partir de músculo de merluza infestado (50 larvas/100 g músculo).....	104
Figura 4.9	Patrón de electroforesis de los extractos de inmunodetección sometidos a diferentes tratamientos de digestión con pepsina y digestión con pepsina más calentamiento, obtenidos a partir de músculo de merluza infestado (50 larvas/100 g músculo)	105

5 APLICACIÓN DE PROCESOS TECNOLÓGICOS PARA REDUCIR O ELIMINAR LA ALERGENICIDAD

5.1 Sistemas modelo de tratamiento térmico de esterilización en productos de la pesca

Figura 5.1	Esquema general del sistema modelo de tratamiento térmico de esterilización en larvas de <i>Anisakis</i>	116
Figura 5.2	Esquema general del sistema modelo de tratamiento térmico de esterilización en músculo de atún con infestación artificial	117
Figura 5.3	Imágenes del proceso de tratamiento térmico de esterilización de conservas de músculo de atún	118
Figura 5.4	Inmunolocalización (IHC) de antígenos de <i>Anisakis</i> 4 en músculo de atún con infestación artificial sometido a diferentes condiciones de tratamiento térmico	125
Figura 5.5	Inmunodetección revelada con antígenos de <i>Anisakis</i> 4 en larvas de <i>Anisakis simplex</i> s.s. y músculo de <i>Thunnus albacares</i> infestado con 12 larvas/100 g músculo (lote 2) sometidos a diferentes condiciones de tratamiento térmico	129
Figura 5.6	Cuantificación por Dot blot (DB) de <i>Anisakis</i> 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de <i>Thunnus albacares</i> infestado con 12 larvas/100 g músculo (lote 2) y sometidos a diferentes condiciones de tratamiento térmico.	130
Figura 5.7	Tasa residual de <i>Anisakis</i> 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> en larvas de <i>Anisakis</i> spp. (lote 3) sometidas a tratamiento térmico de 115°C durante 70 minutos (H)	131
Figura 5.8	Cuantificación por Dot blot (DB) de <i>Anisakis</i> 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) en extractos de músculo de <i>Thunnus albacares</i> infestado con 12 larvas/100 g músculo (lote 3) y sometido a tratamiento térmico de 115°C durante 70 minutos (H)	132

5.2 Estudio comparativo en el tiempo en músculo congelado con infestación natural y artificial

Figura 5.9	Esquema de preparación de muestra para el estudio comparativo en conservación en congelación de músculo de merluza con infestación natural y artificial (12 larvas/100 g músculo)	138
Figura 5.10	Distribución de zonas anatómicas para el estudio comparativo en conservación en congelación en músculo de merluza con infestación natural y artificial (12 larvas/100 g músculo)	139
Figura 5.11	Evolución en el tiempo de la solubilidad proteica (% PS/PT) y extractabilidad de actomiosina natural (NAM) (mg g^{-1} músculo) y sobrenadantes de la extracción de NAM ($\text{mg proteína sob. NAM g}^{-1}$ músculo) durante la conservación en refrigeración ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 0 días) y congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$, hasta 406 días) en lotes de merluza con infestación natural y artificial	144
Figura 5.12	Patrón de electroforesis de actomiosina natural (NAM) y sobrenadantes de la extracción de NAM obtenidos de músculo de merluza infestado natural y artificialmente durante el control en refrigeración ($5\pm 1^\circ\text{C}$) y a los 406 días de conservación en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$).....	146
Figura 5.13	Evolución en el tiempo de Ani s 4 ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo merluza con infestación natural y artificial conservado en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$)	148
Figura 5.14	Variación del porcentaje de proteína bruta (%) de los precipitados obtenidos en la extracción para inmunodetección (ID) de músculo de merluza con infestación natural y artificial (≈ 12 larvas/100 g músculo) y conservado en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$)	150
Figura 5.15	Inmunolocalización de antígenos de Ani s 4 en precipitados obtenidos de la extracción para inmunotransferencia de músculo de merluza (<i>Merluccius merluccius</i>) infestado natural (lotes A y B) y artificialmente (lote C) y conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 106 y 293 días	151

5.3 Aplicación de la tecnología de obtención de surimi-geles

Figura 5.16	Esquema general de elaboración de surimi y geles de surimi	158
--------------------	--	-----

5.3.1 Efecto de la separación mecánica del músculo

Figura 5.17	Esquema del estudio de la separación mecánica de músculo de merluza con infestación natural y artificial	160
Figura 5.18	Imágenes de las operaciones realizadas durante la obtención del músculo tamizado.	161
Figura 5.19	Imágenes de los análisis realizados en las muestras de trabajo: Músculo tamizado (Tn_x) y Residuo (Rn_x).....	164
Figura 5.20	Rendimiento (%) del músculo de merluza obtenido después de la operación de tamizado	167
Figura 5.21	Porcentaje (%) de larvas L3 de <i>Anisakis</i> enteras y rotas en músculo tamizado de merluza	168

Figura 5.22	Microscopia electrónica de barrido (SEM) de músculo ventral de merluza con parasitación natural (lote 2) obtenido después de la operación de tamizado	169
Figura 5.23	Micrografía del cuerpo de una larva de <i>Anisakis</i> spp. encontrada en músculo ventral de merluza (lote 2) tamizado con una combinación de tamices sucesivos (ABC)	170
Figura 5.24	Cantidad de Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo ventral con infestación natural (90 larvas/100 g músculo) (lote 2) luego de la operación de tamizado	171
 5.3.2 Estudios preliminares de lavados y determinación de límites de detección de alérgenos de <i>Anisakis</i>		
 5.3.2.1 Lavados sucesivos tipo surimi y concentración de proteínas de las soluciones de lavado		
Figura 5.25	Esquema del estudio de lavados sucesivos tipo surimi de músculo de merluza con infestación natural y concentración de los extractos para inmunodetección con etanol (EtOH) y ultrafiltración (UF)	176
Figura 5.26	Porcentaje de proteína (%) respecto al músculo inicial en músculo de merluza con infestación natural sometido a lavados sucesivos.....	179
Figura 5.27	Patrón de electroforesis de las soluciones de lavado.....	180
Figura 5.28	Inmunodetección revelada con antígenos de Ani s 4 del músculo lavado y soluciones de lavado obtenidos de merluza infestada naturalmente	182
 5.3.2.2 Lavados sucesivos tipo surimi y selección de soluciones de lavado		
Figura 5.29	Esquema de lavados sucesivos de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) con distintas soluciones de lavados	187
Figura 5.30	Larvas de <i>Anisakis</i> spp. encontradas durante la simulación de la operación de tamizado (diámetro de orificio 3,0 mm) de músculo de merluza con infestación artificial (50 larvas/100 g músculo)	190
Figura 5.31	Patrón de electroforesis de las soluciones de lavado obtenidas de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) sometido a lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$) con diferentes soluciones de lavado	193
Figura 5.32	Cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de merluza infestado (50 larvas/100 g músculo) sometido a lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$) con diferentes soluciones de lavado	195
Figura 5.33	Patrón de electroforesis de los extractos finales para inmunodetección (ID) obtenidos de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) sometido a lavados sucesivos (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^{\circ}\text{C}$) con diferentes soluciones de lavado	197

5.3.3 Lavados sucesivos en músculo infestado refrigerado y en músculo infestado conservado en congelación

Figura 5.34	Esquema general de la etapa de lavados sucesivos de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo)	201
Figura 5.35	Imágenes de la etapa de lavados sucesivos	202
Figura 5.36	Porcentaje de proteína (%) y antígenos de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo lavado y soluciones de lavado.....	211
Figura 5.37	Porcentaje de proteína (%) respecto al músculo inicial y cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) refrigerado ($5\pm 1^\circ\text{C}$, ≤ 3 horas) y conservado en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$, 180 días) y sometido a lavados sucesivos con agua (1:4, p:v; 10 min; $\leq 5^\circ\text{C}$).....	215
Figura 5.38	Porcentaje (%) de detección de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> que representa cada solución de lavado (S1, S2 y S3) en toda la fracción soluble (S1+S2+S3), obtenidas durante la etapa de lavado de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo)	216

5.3.4 Elaboración de surimi y efecto de la conservación en congelación

Figura 5.39	Esquema general de elaboración de surimi a partir de músculo de merluza infestado artificialmente (50 larvas/100 g músculo) lavado con diferentes soluciones y obtenido en la etapa anterior (Apartado 5.3.3)	221
Figura 5.40	Imágenes de la etapa de adición de crioprotectores en el proceso de elaboración de surimi	222
Figura 5.41	Porcentaje de proteína (%) y cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> ($\mu\text{g g}^{-1}$) en músculos lavados y surimis con diferentes crioprotectores, refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 1 día) y conservados congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$, 90 y 180 días)	225
Figura 5.42	Porcentaje de solubilidad proteica (% PS/PT) de surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 300 días.....	229

5.3.5 Elaboración de geles y efecto de la conservación en congelación de geles

Figura 5.43	Diseño experimental del tratamiento aplicado a los geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$) y surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 90 y 180 días obtenidos en la etapa anterior	234
Figura 5.44	Esquema general del estudio de geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 1 día) y surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 90 y 180 días	235
Figura 5.45	Imágenes de la etapa de elaboración de geles	235
Figura 5.46	Resistencia (N mm), Fuerza de rotura (N) y Deformación de rotura (mm) de geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 1 día) y surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 90 y 180 días	240
Figura 5.47	Color (L^* , a^* , b^*) de geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 1 día) y surimis conservados en congelación ($-20\pm 2^\circ\text{C}$) durante 90 y 180 días	243
Figura 5.48	Imágenes de geles elaborados con surimis refrigerados ($5\pm 1^\circ\text{C}$, 1 día).....	244

Figura 5.49	Diferencias estructurales observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) entre surimi y geles del lote 1 (H ₂ O)	246
Figura 5.50	Microscopia electrónica de barrido (SEM) de geles 1 (G1) elaborados con surimis conservados en congelación (-20±2°C) durante 90 y 180 días (C90 y C180)	247
Figura 5.51	Larvas de <i>A. simplex</i> s.s. observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) en una muestra del gel 1 (G1) elaborado con surimi del lote 3 (NaHCO ₃) congelado a -20±2°C durante 180 días.....	248
Figura 5.52	Porcentaje de proteína (%) y cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> (µg g ⁻¹) de geles elaborados con surimis refrigerados (5±1°C, 1 día) y surimis conservados en congelación (-20±2°C) durante 90 y 180 días	250
Figura 5.53	Inmunolocalización de Ani s 4 en surimis (CP1y CP2) y geles (G1, G2 y G3) correspondientes al lote 1 (H ₂ O).....	254
Figura 5.54	Porcentaje de proteína (%) y cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> (µg g ⁻¹) en geles elaborados con surimis refrigerados (5±1°C, 1 día) y surimis conservados en congelación (-20±2°C) durante 90 y 180 días (G90 y G180).....	255
Figura 5.55	Inmunolocalización de Ani s 4 en geles 1 (G1) elaborados con surimi refrigerado (5±1°C, 1 día), almacenados en refrigeración y congelación (-20±1°C) durante 90 días	258
Figura 5.56	Microscopia electrónica de barrido (SEM) de geles 1 (G1) elaborados a partir de surimi refrigerado (5±1°C) y conservados en congelación (-20±2°C) durante 90 días (G90).....	259
Figura 5.57	Porcentaje de proteína (%) y cantidad de Ani s 4 y Extracto crudo de <i>A. simplex</i> (µg g ⁻¹) de músculos lavados, surimis y geles	25